



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	1 / 284

Manual de Prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos I

Mtra. Leonor Aguilar Santelises

M. en C. Araceli García del Valle

Dra. Teresa Corona Ortega

Edición: M. en C. Margarita Cruz Millán

**APROBADO POR EL COMITÉ ACADÉMICO DE CARRERA
DE AGOSTO DE 2022**

Esta obra fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos
Institucionales Para el Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME)

Proyectos PE 206913, PE 211918



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	2 /284

Manual de Prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos I

ÍNDICE

Práctica 1	MANEJO DE APARATOS	8
Práctica 2	MANEJO DE MICROPIPETAS	30
Práctica 3	CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS	45
Práctica 4	MICROSCOPIO ÓPTICO	56
Práctica 5	ESTRUCTURA CELULAR	70
Práctica 6	PRINCIPALES CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MATERIA VIVA	93
Práctica 7	EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA EN ANIMALES Y PLANTAS	103
Práctica 8	EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO	113
Práctica 9	ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	125
Práctica 10	TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS	138
Práctica 11	CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS	146
Práctica 12	SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS	157
Práctica 13	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	167
Práctica 14	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE GERMEN DE TRIGO	187
Práctica 15	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO	200
Práctica 16	CUANTIFICACIÓN DE ADN HUMANO	211
Práctica 17	ELECTROFORESIS DE ADN	219
Práctica 18	EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y METALES PESADOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA SALIVAL	229
Práctica 19	CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA	238
Práctica 20	MITOSIS	253
Práctica 21	FOTOSÍNTESIS	266
Material Básico		275



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	3 /284

PRÓLOGO

Los avances constantes de las ciencias, hacen que los documentos y materiales didácticos deban estar en continua actualización; es por eso que los profesores del módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (BCT I) Laboratorio, han revisado, modificado técnicas y actualizado las prácticas de la versión anterior del Manual de BCT I, además de agregar actividades prácticas novedosas. Para la preparación del presente manual se revisó y actualizó la información de los equipos que se emplean en el laboratorio, se incluyó una actividad práctica para el manejo de las micropipetas, las cuales se utilizarán en el desarrollo de la mayoría de las prácticas, ya que una de las modificaciones hechas fue la disminución de las cantidades de reactivos a emplear lo cual disminuye su costo, tiempo de reacción, disminución de residuos tóxicos, cuidado con el medio ambiente; así como el aprendizaje de procedimientos y uso de instrumentos y aparatos acordes con su actual desempeño profesional.

Debido a la importancia de la biología molecular y la aplicación de las técnicas en diferentes laboratorios clínicos y de investigación, se incluyeron prácticas como las de Obtención de ADN Humano, su Cuantificación y la Electroforesis de ADN, así también la práctica de Electroforesis de Proteínas, los fundamentos de estas técnicas y la realización de las mismas serán de apoyo para la formación más actualizada y acorde a las actividades que un egresado de la carrera de QFB desarrollará en su actividad futura.

La base para este material, fue el Manual de BCT I (primera versión), además del apoyo de alumnos que trabajaron durante su Servicio Social, Tesis, así como el de los ponentes que participaron en cada uno de los cursos intersemestrales impartidos y al de todos los profesores del módulo de BCT I



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	4 / 284

que asistieron a cada uno de los cursos y cursos taller en donde se realizaron las prácticas con la finalidad de detectar los posibles problemas y dudas que se presentaran en su desarrollo, así como adecuarlas al contexto y condiciones del laboratorio, antes de implementarlas con los estudiantes. Este material es producto no sólo de la revisión y actualización sino de la valiosa colaboración de cada uno de los profesores y alumnos que participaron en las diferentes actividades.

La compra de materiales, instrumentos y equipos de laboratorio se ha llevado a cabo durante varios años y con el apoyo de los proyectos PAPIME que se han desarrollado con el objetivo de actualizar y favorecer el desarrollo de la línea curricular bioquímica. Este manual es uno de los productos y esperamos que sea de utilidad para la mejor formación de nuestros alumnos y para su desempeño en los módulos siguientes, así como lograr que su desarrollo profesional sea de mayor calidad.

LAS AUTORAS

Mtra. Leonor Aguilar Santelises

M en C Araceli García del Valle

Dra. María Teresa Corona Ortega

Edición: M en C Margarita Cruz Millán



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	5 /284

INTRODUCCIÓN

El módulo de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (BCT-I) de la Carrera Química Farmacéutico Biológica se imparte en el cuarto semestre y consta de 9 horas de actividades teóricas y 8 de prácticas. El presente Manual es una guía para la realización de las actividades prácticas.

El presente curso (BCT-I) es la primera aproximación que tendrán a la muy especial química de los seres vivos: la bioquímica. Al final del curso teórico y práctico conocerán detalladamente los procesos metabólicos que utilizan los seres vivos y sabrán que dependen fundamentalmente de cuatro tipos de moléculas orgánicas especializadas conocidas como biomoléculas: proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos.

El estudio de la bioquímica es básico para integrar los conocimientos que adquirirán en cada una de las áreas terminales de esta Carrera y será de gran utilidad en su desempeño como profesionales; debido a que los avances vertiginosos en la tecnología a partir de la mitad del siglo pasado han acompañado y favorecido el mejor conocimiento de las biomoléculas y con esto se ha abierto el campo a la Biología Molecular y sus aplicaciones diagnósticas, clínicas, farmacéuticas, alimentarias, agronómicas y médicas; entre otras.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	6 /284

Uno de los objetivos de las actividades prácticas, como complemento a la clase de teoría, es que los estudiantes adquieran habilidades y destrezas necesarias para conocer y experimentar con las propiedades físicas, químicas y biológicas de cada una de las biomoléculas. Al finalizar el curso los alumnos estarán capacitados para el manejo ético y responsable de diversas muestras biológicas y percibirán el amplio potencial de conocerlas y trabajar con ellas.

Debido a que se utilizan materiales provenientes de diversos seres vivos, es importante su seriedad y responsabilidad para el estudio detallado de los antecedentes académicos, la metodología a utilizar y para contar con reactivos y material limpio y suficiente; así como conocer y aplicar las Normas Oficiales vigentes y las Buenas Prácticas de Laboratorio.

El presente Manual contiene 21 prácticas entre las cuales 12 se revisaron, modificaron, actualizaron y se micro escalaron; además 9 son completamente nuevas, todas fueron revisadas y aprobadas por el Comité Académico de Carrera.

Es importante mencionar que el trabajo realizado con las prácticas ya existentes, fue revisar, modificar y actualizar los objetivos, antecedentes académicos, introducciones, métodos, resultados, cuestionarios y bibliografías. Las técnicas y métodos actualizados, fueron validados con la finalidad de que cada grupo de alumnos pueda obtener resultados exactos, precisos y específicos; además de que al realizarlos en micro escala puedan disminuir la cantidad de reactivos utilizados.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	7 / 284

Por otra parte; la implementación de 9 nuevas prácticas especialmente las asociadas a Biología Molecular de ácidos nucleicos y proteínas representan la conjunción de muchos esfuerzos personales e institucionales que abren el camino a nuestros egresados para integrarse a las aplicaciones de vanguardia de esta disciplina como la proteómica y genómica en diversas disciplinas.

Por último, es importante mencionar que como todo material didáctico, éste Manual es susceptible a modificarse y actualizarse, así como que las aportaciones de quienes lo usen serán muy valiosas para las nuevas ediciones; aunado a lo anterior, el presente Manual es una excelente guía para que los alumnos que inician su formación en el área biológica puedan realizar actividades prácticas actualizadas y probadas en nuestras instalaciones, con materiales y equipos obtenidos por apoyos PAPIME y de la misma Carrera, lo que finalmente les ayudará a insertarse en su campo profesional.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	8 / 284

MANEJO DE APARATOS

Objetivos

- ✓ Identificar los principales componentes de los cuatro aparatos de uso común en el laboratorio de BCT I que son: balanza analítica, potenciómetro, centrífuga y espectrofotómetro.
- ✓ Explicar el fundamento y el uso que tienen cada uno de los aparatos.
- ✓ Manejar y cuidar correctamente cada uno de ellos.

Antecedentes académicos

- ✓ Concepto de masa, peso, sensibilidad, precisión y exactitud.
- ✓ Definición de pH.
- ✓ Diferentes tipos de electrodos.
- ✓ Amortiguador.
- ✓ Fuerza centrífuga y velocidad angular.
- ✓ Espectro electromagnético y Espectrofotometría.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	9 /284

Introducción

Balanza Analítica

La balanza analítica es un instrumento indispensable para cualquier procedimiento analítico, ya se trate de un método clásico de análisis estequiométrico o de un método instrumental moderno de naturaleza estequiométrica. Si la determinación de la masa no es absolutamente confiable, el resultado analítico final es inaceptable.

La balanza analítica determina la masa de un objeto y el término peso se utiliza como sinónimo, aunque sea incorrecto. Las balanzas actuales tienen una pantalla digital, capacidades para restar la tara y rutinas de prueba y calibración programadas internamente. Algunas balanzas tienen una capacidad máxima pequeña (de 0.1-1g), mientras que otras balanzas analíticas electrónicas que utilizan células de carga poseen capacidades de hasta 200 g y una facilidad de lectura de ± 0.10 mg ó ± 0.01 mg y poseen salida de datos que permiten incorporarlas a sistemas automatizados. Algunas balanzas pueden registrar en forma continua variaciones del peso con el tiempo (figura 1).

Se emplea principalmente cuando se requieren preparar: soluciones valoradas, soluciones estándar o estándar primario, para realizar alguna valoración, para obtener el peso constante en algunas determinaciones, como humedad y cenizas, en donde es necesario registrar valores de 0.1 mg.

Las instrucciones que se deben seguir para la correcta operación de la balanza analítica son las siguientes:

1. La balanza debe encontrarse nivelada, con la burbuja de aire en el centro, en caso de no estar así, se mueven los tornillos de las patas, hasta llevar la burbuja al centro (figura 2A).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	10 /284

2. Presionar la membrana del botón de encendido (ON O/T), hasta conseguir encender la balanza (figura 2B).



Fig. 1. Vista lateral y frontal de balanza analítica OHAUS®

3. Colocar el objeto a pesar en el platillo y observar el peso en la pantalla (utilizar vidrio de reloj o papel glassine cuando sea necesario). Figura 2C.
4. Presionar nuevamente el botón de encendido, para aplicar la tara, observar que la pantalla indica nuevamente ceros (figura 2D).
5. Pesar la cantidad de sustancia requerida agregando ésta con una espátula, cuidando de no tirar sustancias sobre el platillo o fuera del vidrio de reloj (figura 2E).
6. Retirar el vidrio de reloj o el objeto del platillo de la balanza.
7. Oprimir nuevamente el botón de encendido, para dejar nuevamente la escala en ceros.
8. Finalmente oprima el botón de apagado (OFF/MODE).

Para el correcto uso de una balanza analítica se debe considerar que:

-Del buen uso de la balanza analítica dependen en muchos casos los resultados de los experimentos. Es un instrumento un tanto delicado que con los cuidados adecuados prestará excelentes servicios.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	11 /284

- La balanza analítica deberá estar colocada en un lugar donde los resultados del pesado no estén afectados por vibraciones, radiaciones térmicas, corrientes de aire y donde no reciba directamente la luz solar.
- Los botones de encendido y apagado, deben presionarse con la yema del dedo, no utilizar objetos que puedan dañar la membrana.
- En los platillos nunca deben quedar objetos, después de utilizarla se deberá limpiar con cuidado, sobre todo cuando por accidente alguna sustancia se derrame sobre el platillo.
- Los objetos a pesar deben estar limpios, secos y a temperatura ambiente, además cuando se pesa un recipiente cerrado debe cuidarse que el aire de su interior tenga la misma temperatura y presión que la ambiental.

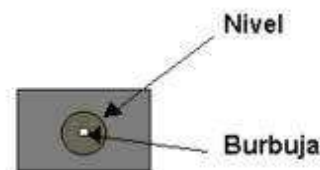


Fig.2A. Burbuja de nivel de balanza analítica



Fig. 2B. Encendido de balanza analítica



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	12 /284



Fig. 2C. Platillo de la balanza analítica



Fig. 2D. Tara de la balanza analítica



Fig. 2E. Uso de espátula al momento de pesar

Los pasos de operación para realizar una pesada en una balanza semianalítica son similares a los descritos anteriormente, ésta tiene una capacidad de pesado mayor y la precisión es de 0.001 g. Generalmente se utiliza cuando se preparan soluciones porcentuales o que no requieran valoración (figura 3).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	13 /284



Fig. 3. Balanza semianalítica OHAUS®

Potenciómetro

El potenciómetro es un aparato que sirve para determinar el pH de una sustancia. El pH se define como el $-\log [H^+]$ y representa la acidez de una solución.

El potenciómetro es un instrumento que se basa en el principio de balance nulo, por el cual el potencial que se va a medir es balanceado por un potencial igual, pero en sentido opuesto. Está constituido por una batería, una resistencia, un electrodo, un galvanómetro y un voltímetro.

La fuerza electromotriz del electrodo se lee directamente en el voltímetro, en una escala de pH que va de 1 a 14. Los electrodos indicadores de iones hidronio son cuatro: electrodo de hidrógeno, el de quinhidrona, el electrodo de vidrio combinado y electrodos de metal-óxido metálico (antimonio).

La carga del electrodo de hidrógeno puede medirse comparándola con un electrodo patrón, es decir, encontrando la diferencia de potencial entre ambos electrodos. Cualquier cambio en la acidez de la disolución hará variar la diferencia de potencial entre los electrodos.

El electrodo combinado contiene la media celda de pH con una solución amortiguadora, sellada en el cuerpo del electrodo, así como su media celda de referencia. El potencial observado será la suma de los potenciales separados de las medias celdas (de pH y de referencia). Puesto que los



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	14 /284

potenciales dentro del electrodo de pH están fijados por la solución de llenado y el potencial del electrodo de referencia es constante, cualquier cambio en el potencial del sistema electródico a una cierta temperatura será debido a cambios de pH de la solución que está siendo medida.

Generalmente los electrodos combinados son de uso común para las determinaciones de pH y valoraciones de neutralización.

En el potenciómetro puede apreciarse una serie de botones de control y una pequeña pantalla (figura 4).



Fig. 4. Potenciómetro HANNA HI 223®

Instrucciones y operación.

Calibración.

- 1.- Encienda el potenciómetro (figura 4A).
2. Pulse la tecla CAL (figura 4B).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	15 /284

3. En la pantalla aparecerá el mensaje “CLEAR CAL”; de inmediato oprima el botón SET CLR (figura 4C).
4. Destape y enjuague el electrodo con agua destilada, e inmediatamente después sumérjalo en solución buffer pH 7 (figura 4D). Los botones de aumento y disminución se utilizan para el ajuste de pH.
5. Agite el vaso de precipitados que contiene la buffer pH 7 hasta que en la pantalla el reloj de arena se apague.
6. Cuando en la pantalla aparezca “CFM”, oprima el botón CFM.
7. Retire el electrodo de la solución buffer y enjuáguelo con agua destilada (figura 4E).
8. Sumerja el electrodo en solución buffer pH 4 y repita el paso 5 y 6.



Fig.4A. Encendido del Potenciómetro.



Fig.4B. Selección de calibración.



Fig.4C. Inicio de calibración.



Fig.4D. Buffer pH 7.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	16 /284



Fig.4E. Lavado del electrodo.

Medición de pH

Sumerja el electrodo en la muestra de la cual se desea conocer el pH (figura 4F). Agite brevemente y registre el pH que se indica en la pantalla (figura 4G).



Fig.4F. Muestra.



Fig.4G. Lectura de pH

Los cuidados que se deben tener al manejar un potenciómetro son los siguientes:

1. Nunca permitir que el electrodo esté sin solución si el potenciómetro está en posición de encendido.
2. Antes de usar el electrodo combinado, se quitan la capucha protectora y la cubierta de agujero de llenado, para permitir el flujo del electrodo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	17 /284

3. Cuando no se utilice el electrodo, se debe llenar el capuchón protector con una solución saturada de KCl y colocarlo en el electrodo. El agujero de llenado debe estar tapado para prevenir la evaporación así como para reducir el flujo de la solución del electrolito a través de la unión.

4. Al transferir electrodos de una solución a otra, éstos deben enjuagarse con agua destilada.

5. Nunca limpie los electrodos con papel o trapo, en caso de ser necesario para quitar el exceso de agua efectúe esta operación: acerque un papel adsorbente y permita, sin tocar el electrodo, que el agua pase por capilaridad al papel.

6. Para optimizar el funcionamiento de los electrodos, antes de efectuar las mediciones, deben equilibrarse a la misma temperatura las soluciones amortiguadoras de calibración y las muestras por medir.

7. El potenciómetro se calibra con una solución amortiguadora patrón con un pH cercano al pH de las muestras por medirse, en caso de no conocer éste, se calibrará con un amortiguador pH 7.

Centrífuga

Las centrífugas clínicas son muy útiles para el trabajo diario en un laboratorio clínico o bioquímico; con ellas se pueden separar suspensiones o trabajar con muestras biológicas, pero al requerir una separación más fina, como por ejemplo de sustancias con peso molecular similar, o de organelos, pueden utilizarse las ultracentrífugas, que poseen una mayor capacidad de separación y requieren cuidados especiales.

La centrífuga es un aparato con el cual puede separarse un sólido de un líquido, gracias a la aplicación de una fuerza centrífuga. Las partículas de distinta densidad, tamaño o forma sedimentan a diferente velocidad, cuando se someten a un campo centrífugo, es decir, un campo gravitacional y la



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	18 /284

velocidad de sedimentación es directamente proporcional al campo G, que está dada a su vez por la siguiente ecuación:

$$G = wr^2 = \frac{4\pi(rpm)r^2}{3600} = \frac{\pi(rpm)r^2}{900}$$

w = velocidad angular rad/seg.

rpm = revoluciones por minuto.

r = distancia radial a partir del eje de rotación hasta la solución.

Las ventajas de la centrifugación son: los precipitados se pueden concentrar en volúmenes pequeños, el precipitado puede lavarse rápida y efectivamente, las soluciones ácidas y básicas concentradas y líquidos corrosivos pueden manipularse fácilmente, separar organelos por medio de la centrifugación diferencial y se pueden determinar los pesos moleculares de macromoléculas con el uso de ultracentrífugas (con velocidades de 50,000 a 30,000 g).

Componentes principales de una centrífuga

1. Interruptor principal de encendido.
2. Botón de frenado.
3. Botón de apertura de tapa.
4. Pantalla.
5. Tapa.
6. Botón de inicio.
7. Perilla rotatoria izquierda.
8. Perilla rotatoria derecha.
9. Etiqueta de identificación del equipo.
10. Tornillo de compensación potencial.
11. Entrada de cable suministrador de corriente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	19 /284



Fig.5.1. Vista frontal y trasera de centrífuga Sigma modelo 2-6®.

Panel de operación.



Fig.5.2. Acercamiento del panel de operación

1. Botón de inicio
2. Indicador del tiempo en la pantalla.
3. Velocidad de trabajo (rpm).
4. Botón de apertura de tapa.
5. Botón de frenado.
6. Pantalla para el rotor, curva de desaceleración y programas.
7. Perillas rotatorias de ajuste.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	20 /284

Instrucciones de operación.

1. Asegurar que el equipo se encuentre ubicado en un lugar firme y se encuentre debidamente conectado.
2. Verter la muestra que se desea centrifugar en un tubo de ensayo teniendo cuidado de no rebasar $2/3$ partes del volumen total del tubo. El tamaño del tubo de ensayo dependerá del tamaño de la camisa de la centrífuga; es decir, el tubo de ensayo debe entrar y salir de la camisa con facilidad.
3. Con la ayuda de una balanza de dos platos, equilibrar el peso de dos tubos de ensayo; el primero de los tubos contendrá la muestra y el segundo contendrá únicamente agua de la llave. A partir de este momento ambos tubos deberán ser manipulados con guantes para evitar al máximo la diferencia de pesos.
4. Colocar el equipo sobre una superficie firme y conectar debidamente a la corriente eléctrica; se oprime el interruptor principal en posición de encendido.
5. Oprimir el botón de apertura de tapa.
6. Introducir ambos tubos a la centrífuga. LOS TUBOS DEBEN SER INSTALADOS SIMÉTRICAMENTE UNO ENFRENTA DEL OTRO (figura 5A).

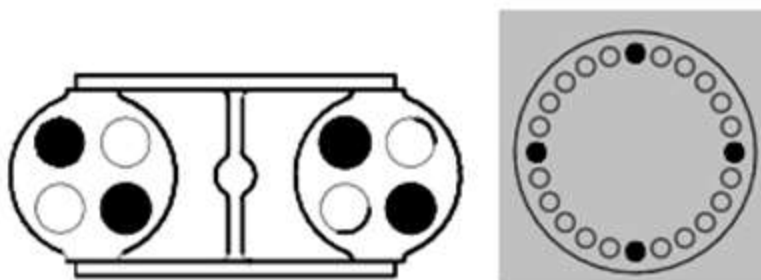


Fig. 5A

7. Cerrar la centrífuga.
8. Ajustar el tiempo y la velocidad deseada con las perillas de ajuste.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	21 /284

9. Una vez que se ajustaron los parámetros deseados; se da inicio al proceso de centrifugado oprimiendo el botón de inicio.

10. El equipo trabajará inmediatamente y de manera automática mostrando el progreso del proceso en la pantalla. No es necesario oprimir el botón frenado para interrumpir el proceso.

Nota. Si los tubos no son equilibrados o son colocados de manera incorrecta; se romperán durante el proceso y se desajustará el equipo. En este caso será necesario oprimir el botón de frenado para interrumpir el proceso inmediatamente.

Los principales cuidados que se deben considerar al usar este equipo son:

1. Los pesos de los tubos deben equilibrarse antes de encenderla, porque de lo contrario se corre el riesgo de que se rompan los tubos de vidrio.
2. Los tubos no deben llenarse totalmente para evitar que se derrame el líquido.
3. La centrífuga debe cerrarse perfectamente antes de encenderla.
4. Al terminar de centrifugar, se debe esperar a que se detenga totalmente antes de levantar la tapa y retirar los tubos, de lo contrario, se corre el riesgo de romper el tacómetro o desbalancear la centrífuga.

Espectrofotómetro

En bioquímica, en determinaciones cualitativas y principalmente en cuantitativas se ha utilizado la propiedad de las sustancias de absorber o transmitir algún tipo de luz que se hace incidir en ellas. Johann Lambert matemático, físico, astrónomo y filósofo alemán observó que existía una relación entre el rayo incidente y el transmitido a través de placas coloreadas de espesor diferentes, anunciando la ley en la que señala que existe una



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	22 /284

relación logarítmica entre la intensidad del rayo transmitido y el espesor de la placa.

Beer aplicó la ley de Lambert a soluciones coloreadas, enunciando la siguiente ley: “La absorbancia de los cuerpos coloreados en solución es directamente proporcional a la concentración, además de serlo a su espesor, dando como resultado la siguiente expresión:

$$A = (E) (e) (c)$$

donde:

A = absorbancia.

E = coeficiente de extinción.

c = concentración.

e = espesor de la placa.

Por lo tanto, al incidir un rayo de luz a través de una cubeta de vidrio, un disolvente y la sustancia disuelta, se tendrán que tomar en cuenta las absorbancias de la cubeta y el disolvente, pero puede eliminarse esto si se utiliza la misma cubeta y el mismo disolvente, además de comparar las absorbancias del problema con el de un patrón.

Los componentes de un espectrofotómetro son:

-Fuente de luz. Proporciona energía radiante en forma de luz visible o no visible. Por ejemplo: lámparas de filamento de tungsteno (para longitudes de onda del espectro visible y el ultravioleta próximo), lámparas de Hidrógeno y Deuterio (para región ultravioleta entre 220-360 nm) y lámparas de carburo de silicio y óxido de zirconio para radiaciones IR (Infrarrojo).

-Rendija de entrada. Reduce la luz difusa y evita que la luz dispersa entre en el sistema de selección de longitud de onda.

-Monocromador (Selector de radiaciones). Difractan el haz de luz. Por ejemplo: prismas que permiten el paso de luz (vidrio para el espectro visible y



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	23 /284

cuarzo para el espectro UV), redes de difracción (son un gran número de líneas paralelas situadas a distancias iguales entre sí y son hendiduras sobre un vidrio o una superficie metálica).

-Rendija de salida. Tiene como función impedir que la luz difusa atraviese la cubeta de la muestra, que provocaría desviaciones a la Ley de Beer.

-Cubeta. Es el recipiente donde se coloca la muestra para la medición. Pueden ser de distintos tipos y tamaños (cuadradas, rectangulares, redondas). Suelen estar fabricadas en vidrio, cuarzo o en plástico.

-Detector. Puede ser de dos tipos: fotocélulas o células fotovoltaicas ó fototubos multiplicadores.

--Medidor. Sistemas de lectura de la energía eléctrica que recoge el detector y que puede ser lectura directa (se utiliza una célula fotovoltaica) o puede ser amplificadores de señal como en el caso del fototubo multiplicador.

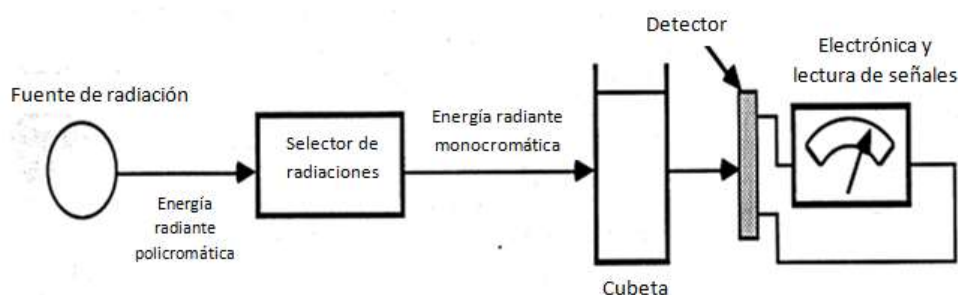


Fig. 6.1 Esquema simplificado de la trayectoria óptica de un espectrofotómetro.

El espectro de absorción en el ultravioleta y el infrarrojo tienen un interés extraordinario para la determinación de la estructura de cuerpos orgánicos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	24 /284

Instrucciones y Operación de espectrofotómetro ThermoSpectronic 20D®:

1. Encienda el aparato girando la perilla de control de encendido/apagado 15 minutos antes de utilizarlo.
2. Seleccione la longitud de onda a la cual se van a determinar las absorbancias, la cual aparecerá en la pantalla.
3. Ajuste la aguja en cero de la escala de transmitancia por medio de la perilla de control de encendido/apagado; cuidando de no apagar el equipo. Asegúrese que el equipo se encuentre en modo transmitancia.
4. Levante la tapa del compartimiento para la muestra y coloque la celda (seca) que contenga únicamente el blanco, que incluye todos los reactivos menos la sustancia problema.
5. Tape el compartimiento donde colocó el blanco y ajuste a 100 la transmitancia con la perilla de control de 100% de transmitancia o cero de absorbancia.
6. Retire del portamuestras la celda que contiene el blanco e inmediatamente coloque la celda que contiene la muestra que desea leer.
7. Cierre la tapa y oprima el botón de modo para elegir el modo absorbancia.
8. Registre el valor de absorbancia de su muestra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	25 /284

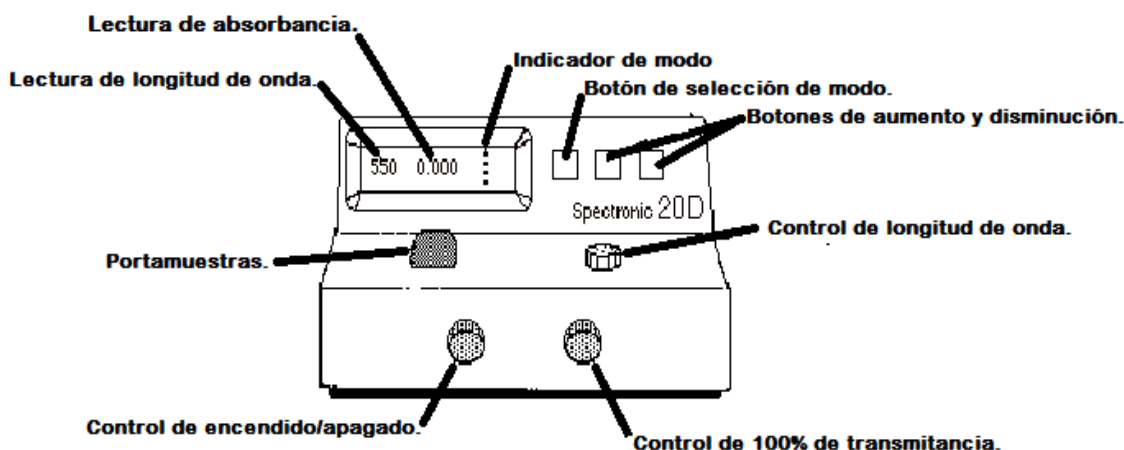


Fig. 6.2 Espectrofotómetro ThermoSpectronic 20D

Instrucciones y Operación de espectrofotómetro ThermoScientificGenesys

20®

El espectrofotómetro ThermoScientificGenesys 20® es un instrumento fácil de usar que ejecuta mediciones de absorbancia, % transmitancia y concentración dentro del rango de longitud de onda de 325 a 1100 nanómetros. Sus componentes son:

Usando el espectrómetro ThermoScientificGenesys 20®, usted puede ejecutar mediciones de absorbancia y transmitancia, y determinar concentraciones usando un estándar conocido o un factor de conversión. Sin importar que tipo de medición desee ejecutar, usted sigue pasos similares:

1. Seleccione el modo (A, %T, C) y la longitud de onda
2. Mida el blanco



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	26 /284

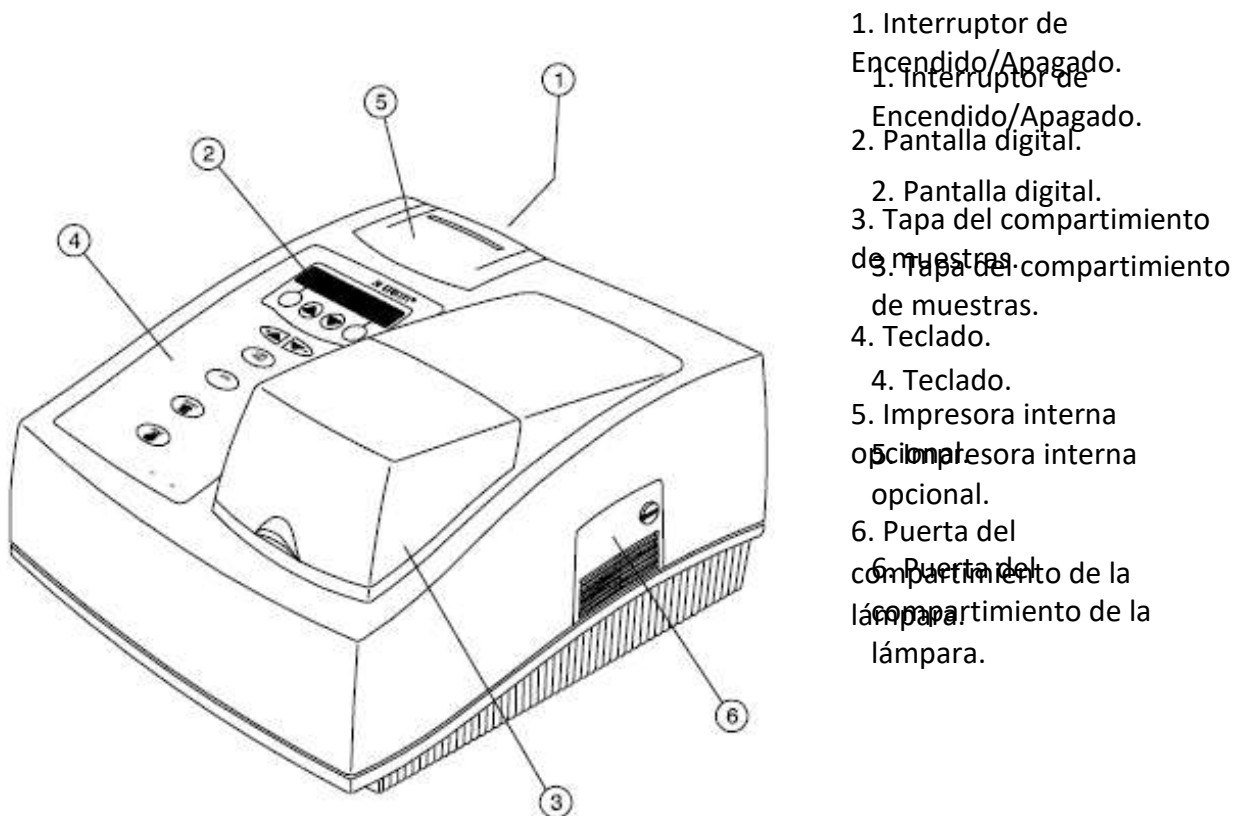


Fig. 7.1. Esquema simplificado de los componentes de un espectrofotómetro ThermoScientificGenesys 20®.

3. Introduzca el valor del estándar o el factor (modo concentración únicamente)

4. Mida las muestras

Usted puede cambiar también los valores prefijados para el instrumento y la impresora accediendo la función de utilidades SETUP.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	27 /284

Instrucciones de operación para realizar mediciones de absorbancias y % de transmitancias:

1. Oprima A/T/C para seleccionar el modo absorbancia o % transmitancia. El modo elegido aparece en pantalla.
2. Oprima nm para seleccionar la longitud de onda. Nota: Mantener apretada la tecla hará que la longitud de onda cambie más rápido.
3. Inserte su blanco en el portaceldas y cierre la puerta del compartimiento de muestras. Nota: Ubique la celda de forma que la luz (indicada por la flecha en la figura 7A) pase a través de las paredes claras.

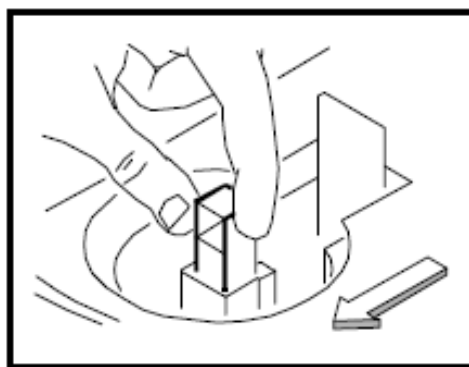


Fig.7A. Posición correcta de la celda.

4. Oprima 0 ABS/100%T para llevar el blanco a 0A o 100%T.
5. Remueva el blanco e inserte la muestra en el portaceldas. La medición de la muestra aparece en pantalla (figura 7B).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	28 /284

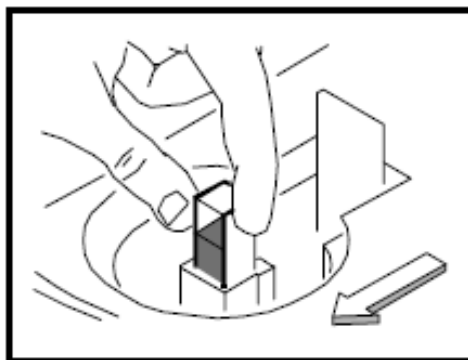


Fig.7B. Retiro de celda.

Los principales cuidados y precauciones a considerar al usar el espectrofotómetro son las siguientes:

1. El espectrofotómetro se debe encender unos 15 minutos antes de utilizarlo, para evitar fluctuaciones en las lecturas.
2. La celda se coloca en el espectrofotómetro haciendo coincidir la marca con la del aparato y sin llenar más de 2/3 partes de su capacidad total.
3. No debe tocarse con los dedos la parte inferior de las celdas y éstas deben limpiarse con un pañuelo tipo kleenex, antes de realizar la lectura.
4. Debe revisarse periódicamente el funcionamiento adecuado del espectrofotómetro con la prueba de calibración con el rojo de cresol.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	29 /284

Cuestionario

1. Defina los términos de masa y peso.
2. ¿Qué es y cómo se utilizan los términos de precisión y exactitud?
3. Mencione 3 experimentos en los que para realizarlos se utilice principalmente el potenciómetro.
4. Explique la ley de Lambert y Beer.
5. Si usted tiene que centrifugar a 3000 g y cuenta con una centrífuga cuyo rotor tiene un diámetro de 20 cm, ¿cuántas rpm tiene que aplicar?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Crouch D, Holler F, Skoog D. Principios de análisis instrumental. 6ª ed. México: Cengage Learning Editores S.A.; 2008.
 1. Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.. [on line] Disponible en: <https://acortar.link/OACG2s> Acceso 2022.
3. Olsen E. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.; 1990.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	30 /284

MANEJO DE MICROPIPETAS

Objetivos

- ✓ Identificar las partes que componen las micropipetas.
- ✓ Aprender el uso adecuado de las micropipetas y seguir los cuidados indicados para su mejor conservación.
- ✓ Realizar el cálculo de la exactitud y del coeficiente de variación de las mediciones con micropipetas.

Antecedentes académicos

- ✓ Manejo de material de laboratorio.
- ✓ Tipos de micropipetas.
- ✓ Calibración de micropipetas.
- ✓ Tipos de errores de medición.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	31 /284

Introducción

Las micropipetas son dispositivos que se caracterizan por carecer de depósito y que se utilizan para medir o trasvasar pequeños volúmenes de líquido de un recipiente a otro con gran exactitud, permiten medir volúmenes pequeños que van desde 0.1 μL y comúnmente hasta 1 mL. Hoy en día existen una gran cantidad de compañías y modelos similares que funcionan bajo un mismo principio de pistones. Por lo anterior, es importante consultar las instrucciones del fabricante sobre el empleo correcto de cada modelo. Una característica común a todas es que utilizan puntas descartables plásticas que se ajustan al extremo de cada modelo de micropipeta. En estas puntas de plástico es donde se deposita el líquido a medir.

Existen micropipetas que sólo miden un volumen fijo y otras que miden volúmenes variables. Las de volumen fijo son más precisas que las de volumen variable. Además, pueden ser usadas de forma manual o electrónicamente automatizada; siendo éstas últimas de alto costo por lo que su uso se limita en equipos automatizados o robóticos.

La pipeta mecánica o de pistón funciona generalmente transmitiendo la fuerza que un operador ejerce sobre un émbolo que se encuentra unido a un pistón mediante un eje que los desplaza a lo largo de un cilindro de longitud fija, forzando un volumen predefinido de líquido fuera de la pipeta.

Las pipetas de pistón de volumen fijo, dispensan un volumen predeterminado de líquido, el cual es conocido como volumen nominal (V_n) y las de volumen variable permiten ajustar el volumen dispensado dentro de un rango determinado en las especificaciones de la pipeta; en este caso, la variación del volumen se logra modificando la longitud de la carrera del pistón dentro del émbolo mediante un micrómetro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	32 /284

Las pipetas de pistón pueden ser de desplazamiento por aire o neumáticas, debido a que existe un volumen de aire entre la cabeza del pistón y el líquido en el cilindro, o de desplazamiento directo por que el pistón se encuentra en contacto directo con el líquido (Fig. 1).

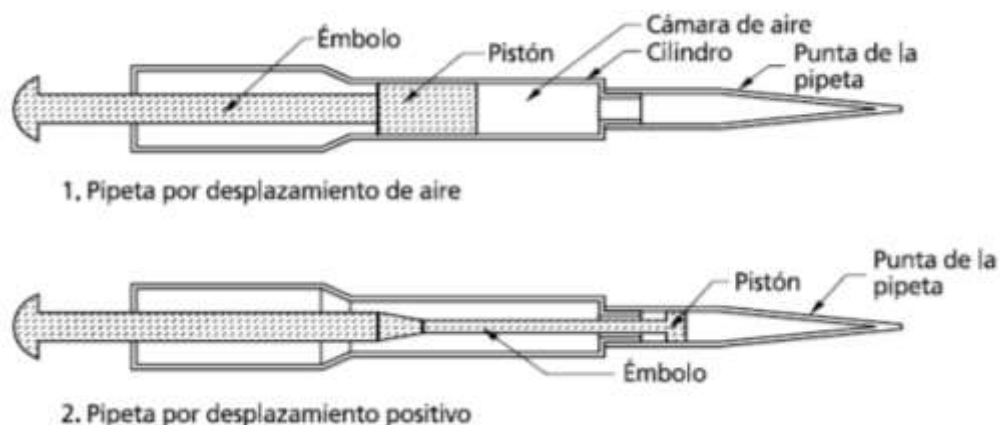


Fig. 1. Tipos de pipetas dependiendo de la forma del pistón. Imagen tomada de Organización Panamericana de la Salud (2005). Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio (178).

equipo de laboratorio (2005).

Para evitar los riesgos de contaminación. Para facilitar el uso del tipo de punta adecuado los fabricantes han adoptado un código de color según el volumen a dispensar (Cuadro 1) y que en las de uso más general coincide con el color de las puntas utilizadas.

Las pipetas utilizadas en nuestros laboratorios son del tipo Gilson® (Figs. 2 y 3). Cada marca tiene sus particularidades, especialmente con el ajuste exacto de las puntas desechables; sin embargo, el uso, cuidado y calibración es similar para todas las de su tipo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	33 /284

Cuadro 1. Capacidad de las pipetas por código de colores

Volumen dispensado por la pipeta. Rango en microlitros μL	Color característico utilizado para identificar
0.1-2.5 μL	Negro
0.5-10 μL	Gris
2.0-20 μL	Gris/ amarillo
10-100 μL	Amarillo
50-200 μL	Amarillo
100-1000 μL	Azul
500-2500 μL	Rojo



Fig. 2. Imágenes de pipetas de la marca Gilson de distintas capacidades.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	34 /284

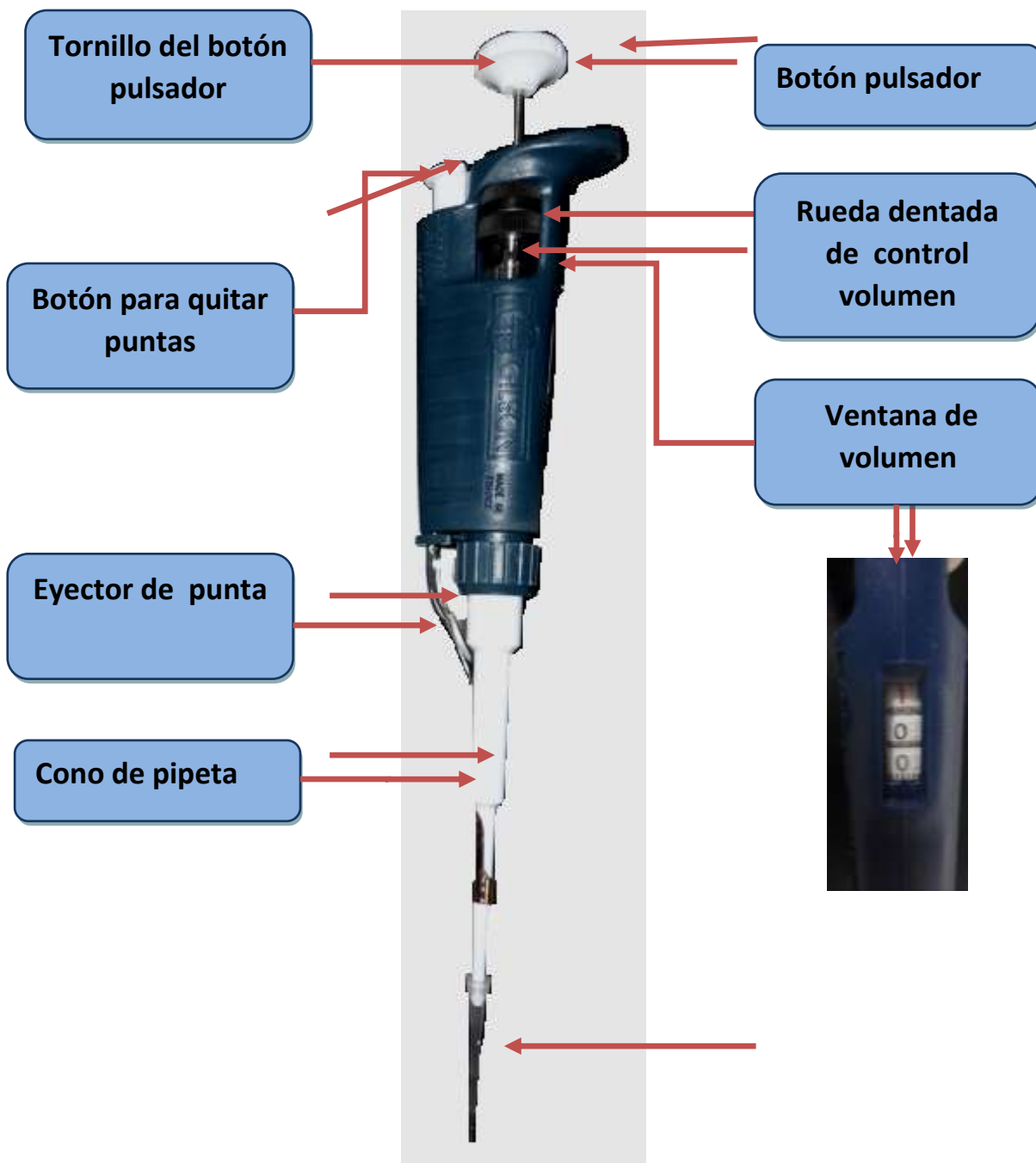


Fig. 3. Esquema de las partes que componen un micropipeta de la marca Gilson.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	35 /284

Recomendaciones para el pipeteo:

- ✓ La profundidad de inmersión de la punta es especialmente importante en el uso de volúmenes pequeños. Si la punta se sumerge demasiado, se aspira más líquido debido al aumento de la presión. Si, por el contrario, la punta no se sumerge lo suficiente, se puede cargar aire con las consiguientes burbujas y volumen inadecuado.
- ✓ Es fundamental mantener un ritmo, velocidad y técnica adecuada al mover el émbolo. Una aspiración demasiado rápida e incontrolada puede llevar a la formación de aerosoles, salpicaduras y posible contaminación del eje y del pistón, lo que puede producir incluso pérdida de volumen de la muestra.
- ✓ Se debe procurar mantener el ángulo de inmersión de la pipeta lo más cercano a la vertical posible. De otra forma, la columna vertical de líquido será más pequeña y se aspirará demasiada muestra. Por el contrario, al dispensar el líquido, la punta se ha de mantener en un ligero ángulo frente a la pared del vaso para asegurar un correcto vaciado.
- ✓ Para la mayoría de aplicaciones se recomienda dispensar con el extremo de la punta apoyado contra la pared del recipiente. Así se reduce o elimina el hecho de que se quede algo de muestra en el interior de la punta después de acabar la dispensación. Retirar la pipeta deslizando el extremo de la punta hacia arriba por la pared lateral para liberar cualquier gota restante en el orificio de la punta. Otra técnica consiste en dosificar directamente en la superficie del líquido. Es crucial usar una punta de pared fina para que no quede ninguna gota en el interior de la punta. Si se dispensa directamente dentro del líquido tendremos que sacar la pipeta manteniéndola en el segundo tope para evitar una toma de muestra después de la dispensación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	36 /284

- ✓ Se recomienda enjuagar previamente las puntas como mínimo dos veces con el líquido a pipetear para compensar la película de líquido en el interior de la punta. El enjuague previo también tiene otras ventajas: ayuda a neutralizar los efectos de capilaridad e iguala la temperatura y humedad del aire del interior de la pipeta con la temperatura y humedad de la muestra.

Material

- Micropipetas p20, p200, p1000 y p5000 μL
- Balanza analítica
- Una caja petri o un vaso de precipitado de 10 mL.
- Puntas desechables para las micropipetas
- Agua destilada

Método

1. Pasos para manejar una micropipeta:

- a. Ajustar el volumen girando la rueda dentada de control de volumen hasta que en la ventana aparezca el volumen deseado.



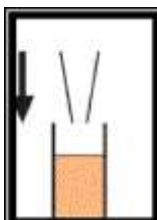


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	37 /284

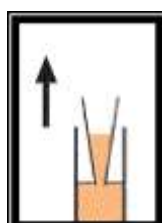
- b. Colocar una punta descartable adecuada en la punta de la pipeta haciendo una leve presión para lograr un buen ajuste.



- c. Oprimir el botón pulsador con el dedo pulgar, **hasta el primer tope y sin soltarlo** introducir verticalmente la pipeta, hasta que la punta se sumerja de 2 mm para volúmenes pequeños, hasta 5 mm para volúmenes mayores dentro del líquido.



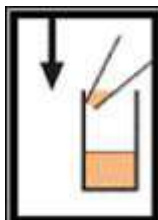
- d. Liberar lentamente la presión sobre el botón, después de 2-3 segundos retirar, siempre verticalmente, la pipeta del líquido deslizando la punta contra la pared del recipiente.



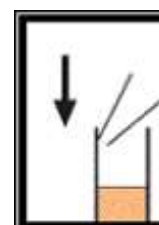


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	38 /284

- e. Apoyando la punta contra la pared del recipiente colocar el líquido, presionar lentamente el botón pulsador hasta el **primer tope**. Después de un segundo, y sin soltar el botón pulsador, terminar de vaciar la pipeta presionando hasta el **segundo tope**.



- f. Retirar la pipeta deslizando la punta contra la pared del recipiente.



2. Precauciones para no dañar el sistema interno de pistones que posee la micropipeta:

- El líquido no debe entrar en contacto con el cono de la micropipeta.
- Nunca invertir la micropipeta con la parte de arriba hacia abajo.
- No colocar la micropipeta en forma horizontal si la punta tiene líquido.
- Jamás ajustar el volumen fuera del rango de la micropipeta (No forzar el tornillo micrométrico de ajuste de volumen).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	39 /284

3. Cálculo de la exactitud (E%) y del coeficiente de variación (CV%):

a. Para cada micropipeta revisar el porcentaje de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%) en todo el rango usando al menos dos volúmenes diferentes y el volumen mínimo y el máximo de la micropipeta.

b. Seleccionar la micropipeta y las puntas adecuadas.



c. Colocar el vaso de precipitado ó una caja petri en la balanza, anotar el peso y tarar a cero.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	40 /284

d. Tomar el volumen de agua destilada con la micropipeta y colocar en el vaso que se encuentra en la balanza.



e. Registrar el peso del agua añadido. La densidad del agua es 1 g/mL a 25°C, por lo tanto, un volumen de 1 mL corresponde aproximadamente a una masa de 1 g, (1 mL = 1000 µL).

f. Repetir el procedimiento diez veces para cada volumen.

4. Cálculo del volumen medio:

Los valores de las pesadas del control gravimétrico son sólo la masa del volumen dosificado. Para obtener el volumen real se debe efectuar un cálculo corrector. El cálculo corrector se realiza por multiplicación del valor medio de los valores de las pesadas (x) con el factor Z (mL/g que es lo mismo que µL/mg), que toma en consideración la densidad del agua, la temperatura de control y la presión atmosférica. Z es igual a 1.0032 µL/mg, referido a 21.5°C, 1013 mbar (hPa) y a la utilización de agua destilada o Z es igual a 1.0029 µL/mg, referido a 20.5°C y 1013 mbar (hPa).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	41 /284

Ejemplo:

Valores del control a 21.5°C (Z = 1.0032 µL/mg)

Volumen controlado Vo (es el volumen de la pipeta que se calibra)

Ejemplo Vo (µL): 20µL (x)

Valor nominal V (mg) = Volumen controlado/ Z

Valor nominal (mg): (20µL / 1.0032µL/mg) = 19.9362mg

x1 =20.0mg x2=19.9mg x3= 19.5mg x4= 19.6mg x5= 19.9mg

Valor medio

$$\underline{x} = \underline{\Sigma xi} / n$$

x= resultado de las pesadas

n = número de pesadas

Volumen medio

$$\underline{V} = \underline{x} * Z$$

$\underline{x}$ = promedio de las pesadas

Z = factor

Exactitud

$$E (\%) = \underline{V} - V_{nominal} / V_{nominal} * 100$$

Desviación estándar

$$S = Z * \sqrt{\frac{\Sigma (xi-x)^2}{n-1}}$$



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	42 / 284

Coeficiente de variación

$$CV (\%) = \frac{S}{\bar{V}} * 100$$

Si los valores calculados de exactitud (E%) y el coeficiente de variación (CV%) son menores que los valores de tolerancia o iguales a éstos, entonces la pipeta está en orden.

Límites de tolerancia

Volumen (µL)	E% nominal	CV % nominal
5-10	1.0	0.8
20-10	0.7	0.4
100-1000	0.5	0.2

Esta metodología permite adiestrarse en el control de la precisión y la exactitud de una pipeta, comparar diversos tipos de pipetas entre sí para detectar si hay diferencias entre ellas. Además, detectar la exactitud y la precisión de un lote de pipetas y controlar factores atribuibles a la utilización de una pipeta por diversos usuarios.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	43 /284

Resultados

- Realizar el análisis de los datos obtenidos con las fórmulas proporcionadas.
- Calcular la exactitud y precisión que tienen las micropipetas utilizadas en el laboratorio.

Cuestionario

1. Defina qué es calibración.
2. ¿Cuáles otros parámetros se utilizan para realizar la calibración de una pipeta?
3. Defina que es exactitud y precisión.
4. ¿Qué marcas de micropipetas son las más comunes?
5. ¿Cuántos rangos de volumen se manejan en las micropipetas y cuáles son?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	44 /284

Referencias

1. Catálogo de Productos de Manejo de líquidos. LT800507/A. USA: Gilson S.A.S.; 2011.
2. García M, Silva M. Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínicos. España: MAD; 2004.
3. Instrucciones de Trabajo Estándar para Pipetas. AESOP13640. Germany: Eppendorf AG; 2013.
4. Organización Panamericana de la Salud. Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio. Washington: 2005.
5. Segal C, Ortega G. Manual de prácticas de biología molecular de la célula I. México: Facultad de ciencias de la UNAM; 2005.
6. User's Guide. PIPETMAN®P. LT801129/A. France: Gilson S.A.S.; 2009.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	45 /284

CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS

Objetivos

- ✓ Desarrollar y analizar una curva estándar.
- ✓ Determinar la concentración de albúmina en la clara de huevo por el método de Lowry.

Antecedentes académicos

- ✓ Espectrofotometría.
- ✓ Ley de Lambert y Beer
- ✓ Curvas de calibrado o curvas estándar.
- ✓ Fundamento del método de Lowry.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	46 /284

Introducción

El adecuado diseño y análisis de una curva estándar es una herramienta indispensable en el trabajo de laboratorio para la determinación cuantitativa de una sustancia.

Entre las determinaciones de curva estándar más utilizadas se encuentran aquellas que proporcionan un resultado colorido proporcional a la sustancia que se desea cuantificar. Con este método fisicoquímico basado en la medición de la absorción de la energía radiante, el analista medirá la absorción en la longitud de onda correspondiente al color obtenido en la reacción.

I. Espectrofotometría

La espectrofotometría es un método de análisis óptico frecuentemente usado en análisis químicos para determinar la cantidad de luz absorbida o transmitida por una solución, y debido a que en el caso de las curvas estándar, ésta es proporcional a la concentración presente, puede indicarnos la concentración exacta al compararla con una solución de concentración conocida. Cabe mencionar que el método espectrofotométrico recibe el nombre según sea la radiación utilizada, como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta o infrarroja.

a) Espectrofotometría de absorción

La espectrofotometría de absorción se basa en la capacidad que poseen algunas sustancias homogéneas de absorber parte de la energía y transmitir el resto cuando un haz de energía radiante monocromática incide sobre ella.

Para familiarizarse con la técnica, a continuación, se presentan algunas definiciones útiles:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	47 / 284

- Absorbancia (A): es el logaritmo en base 10 del recíproco de la transmitancia (T), en el que el disolvente puro es el material de referencia, esto es:

$$A = \log_{10}/T = -\log_{10}T$$

- Absortividad (a): es la relación entre la absorbancia y el producto de la longitud del paso óptico (b) normalmente expresada en centímetros, por la concentración (c). Es decir:

$$a = A/bc \quad A = abc$$

- Coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción (ε): es la absortividad cuando la concentración se expresa en moles por litro y el paso de la luz en centímetros.
- Poder de radiación (P): también llamado flujo de radiación, es la cantidad de energía transportada por un haz de energía radiante y se mide con detectores, tales como fotocélulas, termopares y bolómetros.
- Transmitancia (T): es la relación entre el poder de radiación transmitido por una muestra (P) y el poder de radiación que incide sobre ella (P₀), medidos ambos en la misma posición del espectro y con la misma rendija. Esto es:

$$T = P/P_0$$

b) Espectro de absorción.

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida (ε) a diferentes valores de longitud de onda (λ).

A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	48 /284

el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ($\lambda_{\text{máx}}$). Dicho λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto.

El espectro de la absorción de una sustancia depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula, por lo que cada sustancia absorbente posee su espectro característico. En el desarrollo de nuevos métodos espectrofotométricos, deberá obtenerse siempre la curva espectral de las especies absorbentes con la finalidad de seleccionar la longitud de onda apropiada para el experimento.

II. Curvas de calibrado o curvar estándar

Después de determinar la longitud de onda a la cual deben realizarse las medidas, se procede al desarrollo del método, para lo cual es necesaria la elaboración de un blanco, este deberá contener los reactivos, aditivos, disolventes, etc., en la misma concentración y naturaleza que las utilizadas en la muestra en la que se desarrollará el color, de esta manera, las lecturas de las muestras estarán corregidas automáticamente para cualquier absorción pequeña por acción de los reactivos y disolventes.

En un proceso analíticos se relacionan; la señal (absorbancia) y las características del analito (concentración), de modo que la calibración se realiza para obtener la señal de respuesta como función de la concentración real del analito. Se representan los datos obtenidos y se obtiene la gráfica de la señal corregida frente a la concentración del analito. Lo normal es que la gráfica tienda a una línea recta, donde a medida que aumenta la concentración, la señal de respuesta es mayor (pendiente positiva). La ecuación matemática que representa el modelo de curva de calibración lineal, es la siguiente:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	49 /284

$$y = mx + b$$

Siendo: m = pendiente, x = concentración, y = señal de respuesta (absorbancia), b = ordenada al origen.

Dado que se utiliza un blanco, el valor de b siempre será cero, con lo que m permanece constante y no va a depender de la concentración.

a) Recomendaciones para el diseño de una curva estándar:

- Conocer la concentración aproximada de la sustancia a determinar en la muestra problema.
- Contar con una sustancia patrón en el laboratorio para ser utilizado como referencia.
- Determinar el intervalo de concentraciones del patrón a utilizar, procurando que la elección incida en donde el método ofrezca más sensibilidad.
- Elegir por lo menos 4 concentraciones distintas del patrón.
- Hacer diluciones del problema (si es necesario) para asegurar que los datos que se obtengan estén dentro del intervalo de las concentraciones elegidas del patrón para el experimento.
- Preparar un blanco de reactivos que deberá contener todo menos la sustancia a determinar.
- El volumen final de todos los tubos deberá ser el mismo.
- Realizar la curva por duplicado.

III. Método de Lowry para la cuantificación de proteínas.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	50 /284

El método consta de dos etapas (figura 1):

1. Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -Proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a precipitar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato.
2. La reducción, también en medio alcalino, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo color azul.

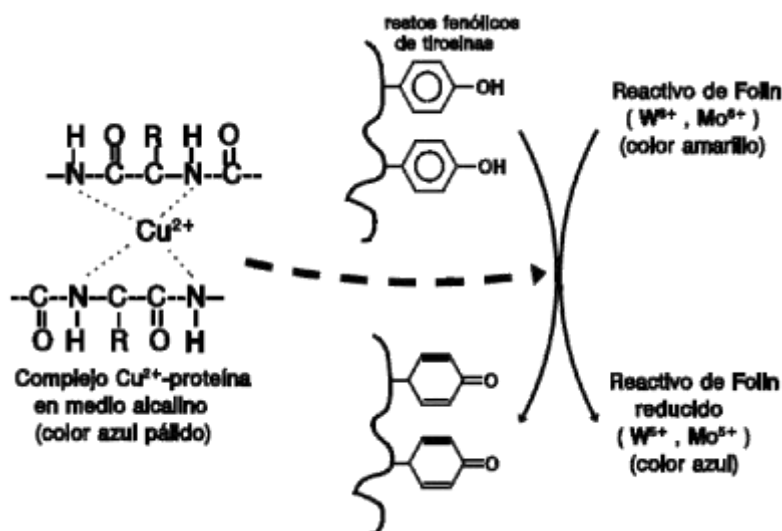


Figura 1. Método de Lowry.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	51 /284

Para la realización de esta práctica se ha elegido en particular el método de Lowry utilizado para la cuantificación de proteína. En este caso se determinará albúmina de la clara de huevo.

Material y Equipo

- Probetas graduadas de 25mL
- Vasos de precipitados de 50mL
- Vasos de precipitados de 100mL
- Vasos de precipitados de 25mL
- Matraz aforado de 10mL
- 1 desyemador
- Pipeta graduada de 1mL
- Tubos de ensayo de 13 X 100
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Gradilla
- Micropipetas. p200, p1000 y p5000 μ L
- Puntas nuevas y limpias para las micropipetas
- Hojas de papel milimétrico.
- Celdas de espectrofotómetro.

Reactivos

- Reactivo 1: Na_2CO_3 al 2% p/v, en NaOH al 0.1 N.
- Reactivo 2: 10 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% p/v en tartrato de sodio y potasio al 1% p/v.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	52 /284

- Reactivo 3: Solución cuproalcalina. Mezclar 50 mL del reactivo 1 + 1mL del reactivo 2.
- Reactivo 4: 10mL de una dilución 1:3 del reactivo de Folin-Ciocalteu con NaOH al 0.1 N.
- Solución patrón de proteínas: 5 mg de albúmina en 50mL de NaOH 0.1N.
 - Colocar 50 mL de NaOH 0.1N en baño de hielo.
 - Pesar en la balanza analítica aproximadamente 5mg de albúmina y documentar el peso real.
 - Colocar 10 mL de NaOH 0.1N frío en un vaso de precipitados con capacidad para 50 mL.
 - Adicionar 5 miligramos de albumina al vaso de precipitados y disolver de forma lenta y suave (no agitar bruscamente).
 - Una vez que la albúmina se encuentre totalmente disuelta, pasar la solución a un matraz volumétrico con capacidad para 50mL y llevar al aforo con NaOH 0.1N frío.
- Solución diluida de clara de huevo.
 - Separar la clara de huevo con ayuda de un desyemador y colocarla en un vaso de precipitados con capacidad para 100mL.
 - Tomar 1mL de la clara del huevo con ayuda de una pipeta graduada de 10mL y colocarla en un vaso de precipitados con capacidad para 25mL. Adicionar 5mL de NaOH 0.1N frío y disolver.
 - Pasar la solución a un matraz volumétrico con capacidad para 10mL y llevar al aforo.
 - Tomar 1 mL y aforar a 100mL con NaOH 0.1N frío.
 - Etiquetar y guardar en refrigeración.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	54 /284

Resultados

- ✓ Con los resultados de los tubos 4, 5, 6 y 7 elaborar en una hoja de papel milimétrico la curva estándar, en la cual se graficará absorbancia contra concentración de albúmina.
- ✓ Interpolar las absorbancias de los tubos problema (albúmina de clara de huevo).
- ✓ Tomar en cuenta las diluciones de la muestra para determinar la concentración de albúmina en 100 mL de clara de huevo y comparar con la concentración teórica.

Cuestionarios

1. ¿Cuál es el fundamento del método de Lowry?
2. ¿Cuál es la concentración teórica de albúmina en la clara de huevo?
3. Que diluciones se tienen que hacer a una solución de 10g/100 mL para obtener una concentración de 10 mg/100 mL.
4. ¿En una curva estándar, se debe tener un volumen final igual en todos los tubos? ¿Por qué?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	55 /284

Referencias

2. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2007.
3. Ayres G. Análisis químico cuantitativo. México: HARLA; 1970.
4. Bender GT. Métodos instrumentales de análisis en química clínica. España: Editorial Acribia; 1992.
5. Castaño F. Espectroscopía UV y visible. España: Alhambra; 1970.
6. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía de validación de métodos analíticos; 2002
7. Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.. [on line] Disponible en: <https://acortar.link/OACG2s>. Acceso 2022.
8. Lowry OH, Rosebrouh NJ, Frr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 1951; 193: 265-275.
9. Olsen E. Métodos ópticos de análisis. Barcelona: Reverté; 1990.
10. Secretaria de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de bio comparabilidad. México: Secretaria de Salud; 2013.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	56 /284

MICROSCOPIO ÓPTICO

Objetivos

- ✓ Identificar los componentes del microscopio óptico que utilizará durante las prácticas posteriores.
- ✓ Analizar el fundamento de distintos tipos de microscopios.
- ✓ Revisar los cuidados que se deben de tener al utilizar un microscopio.
- ✓ Practicar enfocar adecuadamente muestras fijas y en fresco en el microscopio óptico.

Antecedentes académicos

- ✓ Definición de lo que es un microscopio
- ✓ Qué función tiene cada una de las partes del microscopio
- ✓ Fundamento del funcionamiento del microscopio
- ✓ Aplicaciones de los distintos tipos de microscopio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	57 /284

Introducción

El microscopio óptico fue la primera herramienta utilizada para el esclarecimiento de la estructura celular; la microscopía óptica y el uso de técnicas de preparación de secciones finas de tejido y de tinción posibilitó a los citólogos la caracterización de estructuras rodeadas por membranas como núcleos, mitocondrias y cloroplastos en diversos tipos celulares. Aunado a lo anterior, los avances tecnológicos vertiginosos relacionados con la mejora de la óptica y la generación de lentes más sofisticados, condujeron a la aparición de potentes microscopios ópticos como confocales, multifotón y de superresolución.

El límite de resolución de un instrumento óptico hace referencia a la distancia en que deben de estar separados los objetos adyacentes para ser distinguidos como entidades separadas y fue enunciado a finales del siglo XIX por el físico alemán Ernst Abbe aportando la fórmula física para la determinación de esta distancia en la que intervienen tres elementos: la longitud de onda de la luz (λ) que incide sobre el objeto, el índice de refracción del medio (n) y el seno del ángulo desde el cual se observa la muestra ($\sin \alpha$). Por ejemplo, afirmar que el límite de resolución de un microscopio es de 400 nanómetros (nm), significa que los objetos deben de estar separados al menos 400 nm para ser reconocidos como entidades separadas, mientras que una resolución de 200 nm significa que se puede distinguir objetos separados a 200nm, cuanto más pequeño es el límite de resolución de un microscopio mayor es su poder de resolución. El límite de resolución previsto por Abbe para la luz visible, en un rango de longitudes de onda de 400-700 nm, fue de alrededor de 200-300 nm, hasta que apareció el



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	58 /284

microscopio óptico de superresolución que posee un límite de resolución diez veces menor (Fig. 1).

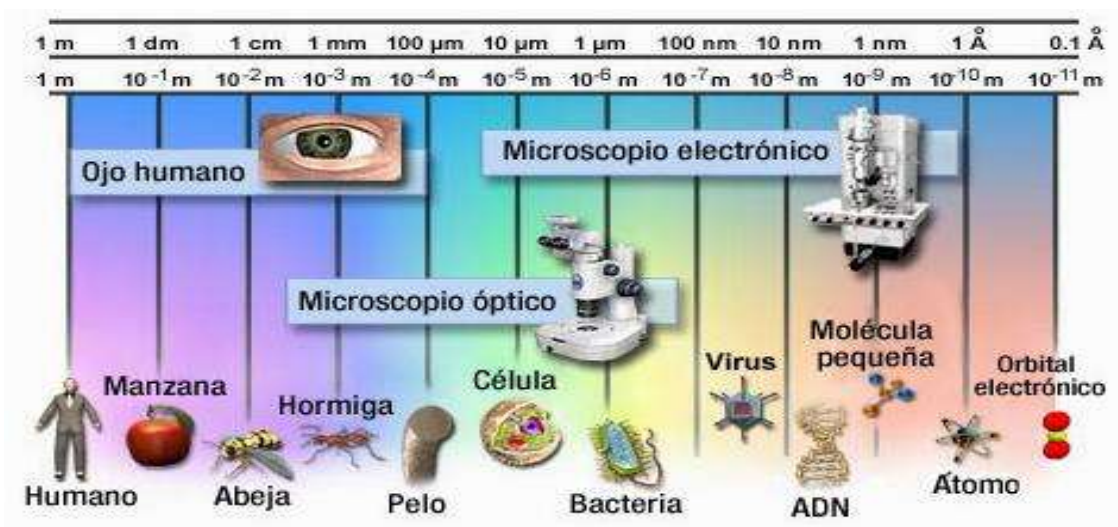


Figura 1. La figura muestra los tamaños relativos de distintos objetos y seres vivos, así como los instrumentos necesarios para detectarlos.

Los primeros microscopios electrónicos aparecieron en las primeras décadas del siglo XX y su límite de resolución aumentó significativamente mediante la sustitución del haz de luz visible por electrones impulsados por una fuente de voltaje que se comportan como ondas de longitud muy pequeña (Fig. 2).

Descripción del recorrido de la luz de un microscopio óptico compuesto

Este proceso comienza con la fuente de iluminación, normalmente una fuente de luz localizada en la base del instrumento. Los rayos de luz procedentes de esta fuente que pasan a través de lentes condensadores que



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	59 /284

dirigen la luz hacia la muestra montada en un portaobjetos de vidrio dispuesto en la platina del microscopio. La lente objetivo, localizada inmediatamente sobre la muestra, es responsable de la formación de la imagen primaria. La mayoría de microscopios compuestos tienen diversos objetivos de distintos aumentos ajustados sobre un revolver rotatorio.

La imagen primaria es posteriormente aumentada por la lente ocular. En algunos microscopios entre objetivo y el ocular se posiciona una lente intermedia para conseguir aún más aumentos. Los aumentos totales de la imagen se pueden calcular multiplicando los aumentos del objetivo, del ocular y de la lente intermedia, así un microscopio con un objetivo de 10X, una lente intermedia de 2.5X, y un ocular 10X, aumentará 250 veces la muestra.

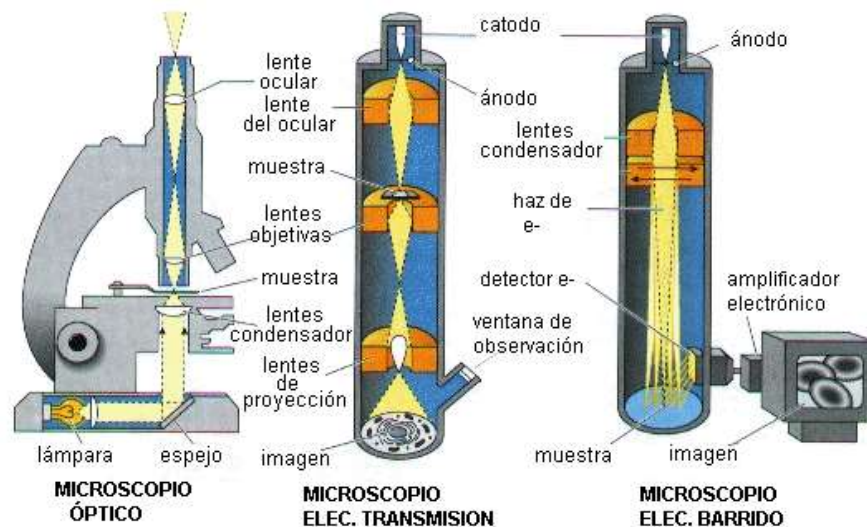


Figura 2. Funcionamiento de tres tipos de microscopio; microscopio óptico, microscopio de transmisión y microscopio electrónico de barrido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	60 /284

Los elementos del microscopio descritos hasta ahora constituyen la forma básica de la microscopia de campo claro, porque la luz blanca pasa directamente a través de la muestra, la cual puede estar teñida o no, dependiendo de las características estructurales que se proyecten examinar.

Parámetros ópticos

Aumento

Es la relación existente entre el tamaño de un objeto percibido a simple vista y el apreciado con el microscopio, es decir, es el número de veces que se ve el tamaño de un objeto por encima de su valor real.

Límite de resolución

La resolución de un microscopio es su capacidad de distinguir dos puntos muy cercanos como separados, es una medida de distancia, por lo que es la distancia mínima entre dos puntos que permite distinguirlos como tales, en lugar de como un único objeto. La distancia resoluble es directamente proporcional a la longitud de onda de la luz empleada e inversamente proporcional a la apertura numérica (AN: $n \sin \alpha$).

$$R = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \alpha}$$

Fórmula de Abbe

Número de campo

Es el diámetro de la imagen observada a través del ocular, expresado en milímetros.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	61 /284

Profundidad de foco

Al enfocar un objeto por medio del microscopio, hay un margen finito por encima y por debajo de este objeto, en el cual se visualizan nítidamente otros objetos. La profundidad de foco es el espesor de la muestra que es posible tener enfocado por completo. La profundidad de foco es inversamente proporcional a la abertura del diafragma y a la distancia de enfoque.

Contraste

Es el grado de diferencia entre el tono, el brillo o el color del objeto estudiado y del medio que lo rodea. Si una muestra tiene poco contraste para mejorarlo, se debe disminuir el cono de iluminación procedente del condensador. El cono de iluminación se controla mediante el diafragma de apertura. El contraste puede aumentarse mediante procedimientos de tinción.

Partes del microscopio y sus funciones

Las partes del microscopio se agrupan en cuatro sistemas: Sistema óptico, sistema de iluminación, sistema de soporte y sistema de ajuste.

1. Los oculares por lo general están provistos con lentes 10X (el grado de amplificación es 10 veces). Las lentes magnifican la imagen intermedia formada por la lente objetivo en el

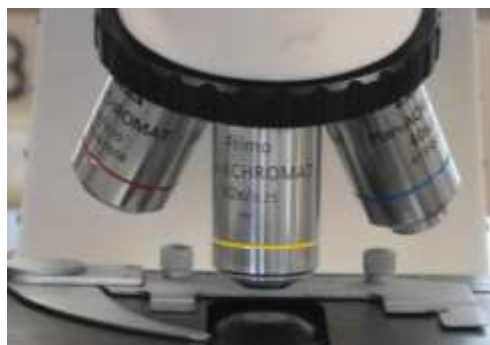




Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	62 /284

tubo óptico, también limitan el área de visibilidad. La mayoría de los microscopios tiene un ocular fijo y uno ajustable. Ambos deben utilizarse de modo correcto para un enfoque óptimo. Los oculares son exclusivos de cada marca y modelo de microscopio por lo que no deben intercambiarse.

2. El control interpupilar se utiliza para ajustar la separación lateral de los oculares para cada individuo. Cuando se ajusta de manera adecuada, el observador debe poder enfocar con ambos ojos con comodidad y visualizar una imagen nítida.
3. El tubo óptico conecta los oculares a la lente objetivo. En esta parte se forma la imagen intermedia.
4. El cuello o brazo proporciona un sitio estructural de adherencia al porta-objetivos (revólver).
5. El pie es el apoyo vertical principal del microscopio. La platina, junto con el condensador y la base, están apoyados sobre el pie.
6. El revólver sostiene los objetivos y permite la rotación fácil de una lente objetivo a otra. La distancia de trabajo entre los objetivos y el portaobjeto varía con la marca y el modelo del microscopio.
7. Por lo general hay tres o cuatro lentes objetivos cada uno con un poder de aumento específico. En el cilindro de cada lente objetivo está grabado el poder de amplificación y la apertura numérica (AN). La AN se relaciona con el ángulo de luz recolectado por el objetivo e indica la capacidad de apertura a la luz de la lente, recordemos que cuanto mayor es la AN, el límite de resolución aumenta.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	63 /284

8. La platina permite el apoyo del portaobjeto que contiene el preparado a observar. Un conjunto de resortes asegura el portaobjeto a la platina.
9. Los controles de foco (o ajustes) pueden estar incorporados en una perilla o como dos controles separados. Cuando se utiliza una perilla, movida en una sola dirección, se activa el control grueso: la inversión de la perilla activa el control fino. Un intervalo de la graduación de gire es equivalente a $2\mu\text{m}$. Muchos microscopios están provistos con dos ajustes separados: el grueso y el fino (tonillo macrométrico y tornillo micrométrico). El orden de uso siempre es el mismo: primero el ajuste grueso y luego el fino.
10. El condensador, que presenta varias lentes reunidas en una unidad, puede estar montado de modo permanente o ser ajustable en sentido vertical con un mecanismo de engranaje. Capta, organiza y dirige la luz de la muestra. Adherido al condensador y en su parte inferior se encuentra la abertura del diafragma, un iris ajustable que contiene varias capas que controlan el ángulo y la cantidad de luz enviada a través de la muestra.
11. La palanca del control gira la lente ubicada arriba del condensador que esta fuera de posición.
12. Los controles de la platina la mueven en ejes x o y.
13. El diafragma de campo está ubicado debajo del condensador, dentro de la base. Cuando está abierto, permite que un círculo de luz de tamaño máximo ilumine el portaobjeto. El vidrio por encima del diafragma del campo lo protege del polvo y del daño mecánico.
14. Los microscopios utilizan focos monocromáticos halógenos de tungsteno como fuente luminosa. Hay dos tipos de iluminación de campo brillante: 1) iluminación crítica en la que la fuente luminosa está representada en la muestra, lo que genera un brillo incrementado pero desigual y 2) el sistema Koehler en el que la fuente luminosa está



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	64 /284

representada en el diafragma de apertura del condensador. El resultado final de la iluminación de Koehler es un campo brillante distribuido de manera uniforme a través de la muestra.

Conservación del microscopio

1. Transportar el microscopio sujetándolo fuertemente con las dos manos, para evitar el riesgo de que se caiga, colocar una mano debajo de la base como apoyo y con la otra sujetarlo con firmeza alrededor del brazo. Tener cuidado de no dejar caer los oculares.
2. Cuando no está en uso, el microscopio siempre debe de estar cubierto con una funda.
3. Antes de su uso, inspeccionar sus elementos. Si se encuentra polvo, quitarlo con una jeringa con aire, un cepillo de camello o una tela suave que no deje pelusas. Si se utiliza el papel para lente directamente en una lente sucia, sin el retiro del polvo, se puede rayar la lente.
4. Evitar colocar los dedos sobre la superficie de la lente. Las huellas digitales afectan el contraste y la resolución de la imagen. Para limpiar huellas dactilares y manchas de grasa depositadas sobre las lentes se puede usar una gasa humedecida ligeramente en alcohol puro.
5. Para limpiar los lentes, no se recomienda el uso de xilol debido a que contiene compuesto carcinógeno (benceno) y porque es un agente de limpieza deficiente que deja una película oleosa en la lente. Para limpiar los objetivos puede utilizarse hidróxido de amonio o alcohol isopropílico al 70% en forma escasa sobre un algodón en un palillo aplicador. El alcohol debe mantenerse alejado de las lentes ya que puede disolver el cemento y agregarse a la parte posterior de la lente.
6. Cuando se agrega aceite fresco al aceite residual en el objetivo 100X, puede haber pérdida de contraste. Primero, debe eliminarse todo el



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	65 /284

aceite residual.

7. No utilizar agua para limpiar las lentes. La respiración condensada del operador en la superficie de la lente puede ser útil en la limpieza de las lentes ligeramente sucias.
8. Limpiar los otros componentes del aparato, que no son las lentes, con un paño humedecido en agua destilada.

Material y Equipo

- Microscopio
- Papel seda
- Laminillas de muestra

Método

Manejo del microscopio

1. Accionando el revólver se coloca el objetivo adecuado. Se sabe que el objetivo está adecuadamente colocado cuando se percibe un audible clic. Se empieza enfocando con un objetivo de poco aumento y luego se pasa a otro de mayor aumento, al hacerlo, basta con mover ligeramente el micrométrico para enfocar la muestra con este último objetivo.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	66 /284

- 2 Bajar completamente la platina y colocar la preparación sobre ella, teniendo cuidado de no ponerla al revés. Accionando los tornillos reguladores de la platina, desplazar la preparación hasta situar la muestra sometida a estudio sobre el orificio de paso de luz.



- 3 Encender la fuente de luz y regularla a una intensidad media para evitar que se sobrecaliente.



4. Situar el condensador:

- Bajo, si se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación (10X).
- En la mitad de su recorrido, si se emplea un objetivo de mayor poder de ampliación (40X).
- Alto, si usa un objetivo de inmersión (100X).
- También conviene ascender el condensador si se observa una muestra teñida y descenderlo si se estudia una muestra en fresco.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	67 /284

5. Mirando por fuera de los oculares, hacer ascender la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objetivo este muy cercano a la preparación, cuando se utiliza un objetivo de poco poder de ampliación el aparato tiene un tope que impide un acercamiento excesivo de aquel a la preparación. En cambio, el objetivo de inmersión no tiene tope para que pueda estar lo más cercano a la muestra por lo que antes de colocarlo es necesario cuando ya se va a observar con el objetivo depositar una pequeña gota de aceite sobre la preparación moviendo el revólver a la posición intermedia. Después dejarlo caer suavemente en la preparación previamente enfocada con un objetivo de menor aumento.

6. Ajustar la distancia interpupilar.



7. Moviendo el tornillo macrométrico, hacer descender lentamente la platina hasta que se vea, mirando por los oculares, la imagen de la muestra. Cuando se use el objetivo de inmersión, nunca debe separarse de la preparación como para perder el contacto con el aceite.

8. Afinar el enfoque con el tornillo micrométrico. Desplazando horizontalmente la platina con movimientos en zig-zag, recorrer con el objetivo toda la preparación, para realizar una correcta observación de la misma. Durante la observación, mover continuamente el tornillo micrométrico, para enfocar sucesivamente todos los planos de la muestra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	68 /284

9. Una vez finalizada la observación, hacer descender totalmente la platina y retirar la preparación, limpiar los objetivos y oculares.

10. Apagar la luz de la fuente.



Resultados

- Realizar un diagrama de flujo que muestre los pasos a seguir cuando se enfoca una muestra para la observación al microscopio.

Cuestionario

1. ¿Cómo se dividen los sistemas que componen un microscopio?
2. ¿Menciona que tipo de muestras puedes observar en un microscopio óptico?
3. ¿Qué función tiene el tornillo macrométrico y micrométrico?
4. ¿Qué entiende por límite de resolución? ¿Qué factores influyen para determinarlo?
5. ¿Cuáles son las características de un microscopio de contraste de fases y un microscopio electrónico?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	69 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Anne B. Anne E. Lesak. Libro de laboratorio de Anatomía y fisiología, Barcelona: Paidotribo; 2002.
3. Rodak F. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas, 2ª ed. Buenos aires, Argentina: Médica Panamericana; 2005.
4. Rubio F. Espinosa B. Carrasco M. Fundamentos y técnicas de análisis hematológico y citológico. España: Ediciones Parainfo S.A.; 2004.
5. Wayne M. Becker J. Kleinsmith J. El mundo de la célula, 6ª ed. Madrid: Pearson PLC; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	70 /284

ESTRUCTURA CELULAR

Objetivos

- ✓ Analizar las características específicas de las células eucariotas que le permiten diferenciarla de las procariotas.
- ✓ Describir la estructura de la célula y sus organelos.
- ✓ Realizar preparaciones sencillas de organismos eucariotas y procariotas.
- ✓ Revisar los fundamentos de distintos tipos de tinciones.
- ✓ Observar e identificar en el microscopio algunos componentes celulares.

Antecedentes académicos

- ✓ Teoría celular.
- ✓ Estructura celular de los organismos eucariotas y procariotas.
- ✓ Función de los organelos celulares.
- ✓ Tipos de tinciones usadas frecuentemente en la microscopia óptica.
- ✓ Fundamento y manejo del microscopio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	71 /284

Introducción

La historia de la biología celular comenzó hace más de 300 años cuando algunos científicos europeos comenzaron a enfocar en sus microscopios diversos materiales biológicos, desde la corteza de los árboles hasta el espermatozoide humano. Uno de esos científicos fue Robert Hooke que en 1665, empleó un microscopio construido por él mismo para examinar secciones finas de corcho. Observó una red de pequeños compartimientos en forma de caja que le recordaron a un panel, Hooke denominó a esos pequeños compartimientos *cellulae*, término que en latín significa pequeñas habitaciones del cual deriva el término actual de célula.

En el desarrollo de la teoría celular se distinguen tres periodos: el primero se centró en establecer la estructura de la célula y está muy ligado a la invención y mejoramiento de los microscopios; el segundo se caracteriza por el desarrollo del trabajo experimental para ligar las estructuras celulares con su función y el tercero se refiere a la descripción de las funciones de los elementos celulares a nivel molecular.

La célula es la unidad de la vida; los organismos están formados por células, ya sea una en los organismos unicelulares o muchas especializadas en los organismos multicelulares. Las células se distinguen por realizar dos procesos fundamentales para la vida: transferir información a otras células hijas o vecinas y poseer una maquinaria para la transducción de energía, la cual transforma la energía de una forma a otra, la almacena y la distribuye para su utilización.

La teoría celular moderna apoya cuatro postulados:

- Todos los organismos están formados por células.
- Las reacciones químicas de los seres vivos, incluyendo los procesos de obtención de energía y las reacciones de biosíntesis, tienen lugar en el interior de las células.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	72 /284

- Las células provienen de otras células
- Las células contienen la información hereditaria de los seres que forman y esta información pasa de las células madres a las hijas.

Las células no se ven a simple vista; su tamaño se encuentra por lo general en el rango de micras. Para ver las unidades más pequeñas de la vida se debe utilizar el microscopio y al comparar células procariotas y eucariotas se observan diferencias esenciales. Las procariotas, como las bacterias, miden entre 1 a 10 μm , por lo que son mucho más pequeñas que las típicas eucariotas (aproximadamente 10-100 μm) y con ello su volumen es unas mil veces menor. Mientras que el interior de las células procariotas está relativamente desestructurado pues no cuenta con núcleo ni con unidades funcionales claramente delimitadas, la célula eucariota presenta una compartimentación clara en la que domina el núcleo.

● Células eucariotas

Las células eucariotas contienen junto con su membrana plasmática, un sistema extenso de membranas intracelulares que delimitan compartimentos que desempeñan funciones especializadas, llamados organelos. El ADN está separado del citoplasma por una envoltura membranal doble que delimita el núcleo.

Hongos

El aspecto de los hongos resulta familiar, pues los hemos visto de forma macroscópica como alimentos o creciendo sobre los limones, las naranjas, los quesos (Fig. 1), el pan y la mermelada viejos, así como en las cortinas plásticas de los baños; con apariencia de filamentos (comúnmente conocidos como lama). Aunque su tamaño y morfología presentan mucha variedad, todos los hongos son eucariotas, por tanto, sus células poseen al menos un núcleo, envoltura nuclear y demás organelos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	73 /284

Se reconocen tres grandes grupos de hongos; los mohos u hongos filamentosos (pluricelulares), las setas u hongos de masa también pluricelulares, y las levaduras, generalmente unicelulares.

Debido a sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y ecológicas; en la actualidad los hongos se ubican en su propio reino llamado Fungi. Este reino está compuesto por organismos heterótrofos, quimioorganótrofos, es decir que requieren de compuestos orgánicos para su nutrición, por lo que secretan enzimas que descomponen una gran variedad de sustratos. Cuando se alimentan de materia orgánica muerta se conocen como saprofitos y generalmente no causan enfermedades. Los hongos saprofitos son importantes en las fermentaciones industriales, por ejemplo, en aplicaciones biotecnológicas en la producción de metabolitos secundarios la penicilina y fármacos inmunosupresores (como la ciclosporina) o en la industria láctea en la producción de quesos.



Fig. 1 Foto de queso contaminado con hongos, se observa el crecimiento de las colonias de hongos de color verde y blanco

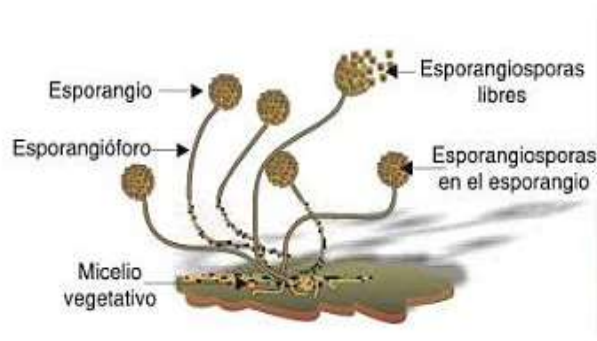


Fig. 2 Esquema general de la reproducción asexual del hongo *Rhizopus nigricans* donde se diferencian claramente cada una de las partes que lo conforman



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	74 /284

Las levaduras son hongos unicelulares, varían considerablemente en cuanto a tamaño oscilando entre 1 y 5 μm de ancho y 5 a 30 μm de longitud, cada especie tiene una forma característica. Las levaduras no poseen flagelos ni ningún otro tipo de órgano de locomoción, las levaduras se reproducen asexualmente por gemación y algunos géneros pueden hacerlo de forma sexual formando células especializadas llamadas ascosporas.

Los hongos pluricelulares (mohos) están constituidos por filamentos tubulares llamados hifas, cada hifa tiene aproximadamente 5 a 10 μm de anchura y 1 μm de diámetro. En el interior y a lo largo de cada hifa existe un citoplasma común para toda su extensión. La hifa es la unidad estructural y funcional del hongo, según la clase de hongo, la hifa puede ser no septada, septada, septada uninucleada o septada polinucleada.

En los hongos pluricelulares, la reproducción asexual es la más común y no hay contacto de núcleos; puede ser por fisión (separación simétrica), gemación (separación asimétrica) o esporas asexuales. Los hongos que sólo presentan este tipo de reproducción son llamados hongos imperfectos. La reproducción sexual se caracteriza por la fusión de los núcleos que da origen a un cigote. Este tipo de reproducción se relaciona con la evolución y de ella se originan los hongos perfectos. Existen varios tipos de esporas sexuales: zigosporas, ascosporas, basidiosporas y oosporas (Fig. 2).

Protozoarios

Los protozoarios son organismos eucariotas predominantemente unicelulares y de tamaño microscópico. Un protozoario típico es unicelular, sin pared celular, heterótrofo, móvil y capaz de ingerir partículas de alimento. La mayoría de los protozoarios poseen un solo núcleo, pero algunos como los ciliados tienen dos núcleos diferentes. Existen, además, algunos de ellos que pueden presentar dos núcleos iguales y aun otros que pueden ser



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	75 /284

multinucleados. El citoplasma de los protozoarios está constituido por dos partes bien diferenciadas, conocidas como el endoplasma y el ectoplasma; en el agua encharcada es muy común encontrar protozoarios del género *Paramecium* (Fig. 3).

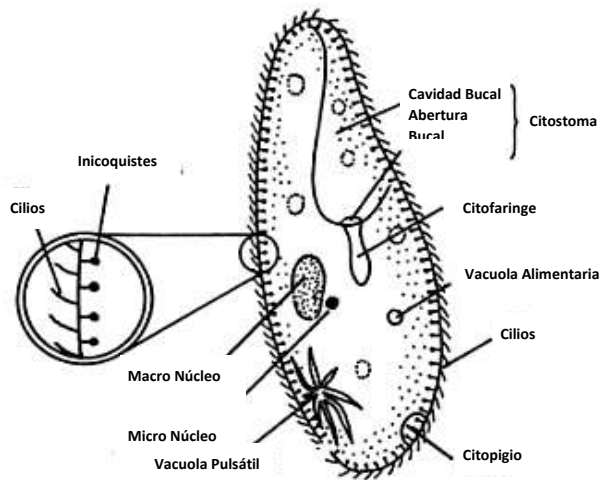


Fig. 3 Esquema de un paramecio y sus principales estructuras.

Células vegetales

Las células vegetales son eucariotas, se caracterizan por tener pared celular, además de la membrana celular, ser autótrofas gracias a la presencia de cloroplastos para realizar la fotosíntesis y poseer una vacuola interna para regular su tamaño contenido por la pared celular.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	76 /284

Células epiteliales

Estas células forman un tejido altamente especializado presente en muchos órganos. Presentan características estructurales distintivas como son la disposición en capas cohesivas, las uniones especializadas entre una y otra célula, la secreción de diversas sustancias y la diferenciación baso lateral y superficial, gracias a las cuales realizan funciones diversas. Puesto que las células epiteliales se encuentran muy juntas, con sustancia intracelular escasa, o nula, forman láminas continuas que no contienen vasos sanguíneos.

Células sanguíneas

Las células de la sangre que podemos distinguir en un frotis son los eritrocitos (glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos) y los trombocitos (plaquetas). Los eritrocitos se ocupan del transporte sanguíneo de los gases. Entre los leucocitos se encuentran las diferentes formas de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los monocitos y los linfocitos, todos ellos con funciones en el sistema inmunológico de defensa. En cuanto a sus funciones los granulocitos neutrófilos, los monocitos y los macrófagos derivados de los monocitos son células fagocitarias (fagocitos) que pueden captar los agentes patógenos invasores y degradarlos. Los linfocitos pueden ser de dos tipos, los B producen anticuerpos mientras que los linfocitos T dirigen la respuesta inmune o destruyen células infectadas por virus y células tumorales. Los granulocitos eosinófilos y basófilos tienen funciones especiales en la defensa contra parásitos y en las alergias. Los trombocitos o plaquetas son restos celulares derivados de grandes células precursoras



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	77 /284

producidas en la médula ósea, los megacariocitos, cuya función principal es promover la hemostasia.

- **Células procariotas**

Etimológicamente procariota significa con núcleo primitivo, de hecho el ADN de las células procariotas tiene forma circular y nunca está separado del citoplasma por una membrana.

Las células procariotas difieren de las eucariotas en:

- La presencia de una pared constituida por peptidoglucanos o lipopolisacáridos
- Su tamaño
- Su molécula de ADN libre y circular, siempre en contacto con el citoplasma, desprovista de nucleosoma; sin embargo, este ADN está asociado a una histona denominada HU, que cumple varias funciones y en particular la de reparar el ADN.
- La ausencia de mitocondrias (la cadena respiratoria se localiza en la membrana plasmática de la bacteria) y de cualquier otro organelo limitado por membrana (Golgi, RE, lisosomas y peroxisomas, entre otros).
- La ausencia de mitosis y de meiosis (los procariotas se reproducen asexualmente por fisión binaria o gemación).
- Sus ribosomas se parecen a los de mitocondrias y cloroplastos, para cuya síntesis no es necesaria la presencia del nucléolo.

Bacterias

Las bacterias son un ejemplo de organismos procariotas. El tamaño de las bacterias está comprendido entre 1 a 10µm, las bacterias poseen una pared



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	78 /284

celular de composición diversa, poseen un citoplasma que soporta al material genético, membranas internas, ribosomas y diversas inclusiones que pueden ser de glucógeno, azufre, polihidroxialcanoatos, polifosfatos o vacuolas de gas en aquellas fotosintéticas. También pueden poseer pili, que son expansiones cortas y rígidas que se adhieren a la membrana plasmática; uno o varios flagelos, que son expansiones motoras del citoplasma. Las bacterias se reproducen por gemación o por fisión, lo que en algunos géneros da origen a agrupaciones características, al quedar las células unidas de determinada forma. No obstante, cada célula es fisiológicamente independiente. En cuanto a su morfología pueden ser cocos ó bacilos.

Cocos

Según los planos del espacio en los que se produzca la división y la incapacidad de las células para separarse completamente; pueden originarse diplococos cuando la división se produce en un solo plano quedando dos elementos; estreptococos, si la división tiene lugar en un plano pero en forma sucesiva originando cadenas. Si la división se produce en dos planos, el resultado es una tétrada y cuando la división afecta tres planos en forma ordenada, se forma una sarcina, la forma irregular conduce a un aspecto comparable con un racimo de uvas o estafilococo. Si los cocos son de tamaño más pequeño y sin agrupación especial, son llamados micrococos.

Bacilos

Las bacterias de formas alargadas reciben el nombre de bacilos (del latín bacillus; bastón); cuando estos se visualizan individualmente, pueden tener extremos redondeados y un diámetro menor bien uniforme; otros géneros muestran sus extremos afilados en forma de huso y se denominan fusiformes. Algunos bacilos poseen una de sus terminaciones abultada en



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	79 /284

forma de clava o maza. Por último ciertos bacilos parecen cortados a pico o en forma recta. Hay un grupo de bacilos que durante muchos años se consideraron hongos, porque se ven como filamentos y con otras ramificaciones, son los bacilos filamentosos. Los bacilos también pueden quedar agrupados en forma característica; existen agrupaciones en cadenas, estreptobacilos, y cuando los bacilos se presentan unidos uno al lado del otro según su eje mayor, se dice que están en empalizada. Otra forma es la que se origina cuando quedan unidos por algún punto, lo que produce formaciones diferentes (Fig. 4). Entre los cocos y los bacilos hay microorganismos de apariencia intermedia por su tamaño y morfología que se conocen como cocobacilos.

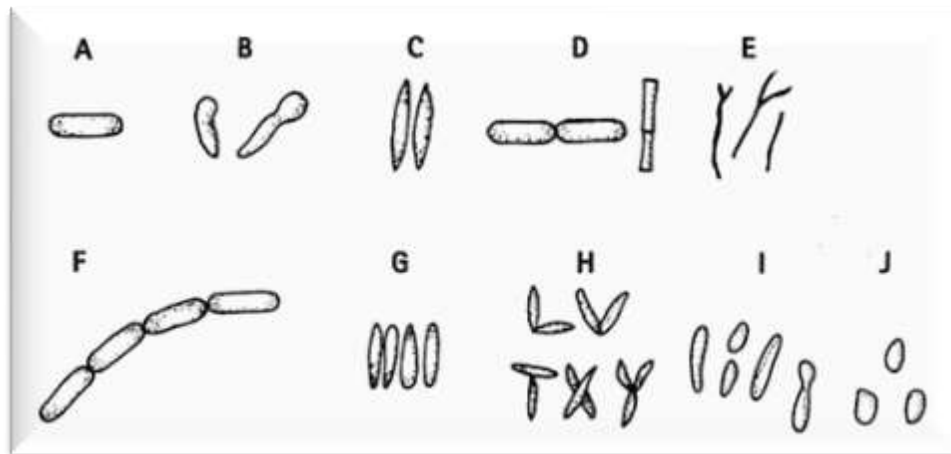


Fig. 4. Formas y agrupaciones de los bacilos. A. Bacilo común B. Claviforme C. Fusiforme D. Cortado a pico E. Filamentoso F. Agrupación en Estreptobacilos G. Agrupación empalizada H. Agrupación en letras I. Pleomórficos J. Cocobacilos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	80 /284

Morfologías bacterianas prevalentes en la cavidad bucal

Las morfologías bacterianas que prevalecen en la cavidad bucal de las personas sanas consisten en diversos tipos de estreptococos, variados bacilos (especialmente del tipo filamentosos) y diplococos. Cuando cambian las condiciones locales como una disminución de la tensión de oxígeno o el aumento de ciertas sustancias, es posible visualizar casi todos los morfotipos de interés médico.

● Tinciones

La tinción es un conjunto de procesos que conducen a la coloración de las estructuras que componen las células, tiene por objeto aumentar el contraste entre esas estructuras y el medio que las rodea permitiendo que las células sean visualizadas microscópicamente con mayor facilidad.

Tipos de tinción

Las tinciones vitales son aquellas que se realizan en células que están vivas sin matarlas, se coloca el colorante sobre un organismo vivo. Ejemplos de colorantes vitales son el verde Jano y el azul de metileno.

Las tinciones supravitales son aquellas que se realizan sobre células o tejidos vivos, pero que están aislados del organismo del que proceden.

Las tinciones no vitales se realizan sobre células muertas por fijación que tiene por objeto el conservar inalterada su estructura y mantener su adhesión al portaobjetos. La fijación puede realizarse mediante calor, aunque habitualmente se realiza con etanol, metanol, glutaraldehído o paraformaldehído.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	81 /284

Tinciones tradicionales y especiales

Tradicionalmente las tinciones se han logrado mediante el uso de colorantes que con frecuencia derivan de la anilina, estos colorantes se reúnen en cuatro grupos:

- Colorantes ácidos: tienen una especial afinidad por las estructuras alcalinas de las células, como por ejemplo la hemoglobina, el más usual de ellos es la eosina.
- Colorantes básicos: tienen una especial afinidad por las estructuras ácidas de las células, como por ejemplo los ácidos nucleicos.
- Colorantes neutros: son sales de un ácido y de una base coloreada. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro. Por ejemplo el eosinato de azul de metileno.
- Colorantes indiferentes: son los que no tienen afinidad por estructuras ácidas o básicas. Son insolubles en agua y tiñen aquellas sustancias que tienen un poder de disolución superior al del líquido empleado para preparar la solución colorante. Uno de ellos es el Sudan III empleado para teñir grasas.

También hay combinaciones de colorantes que dan lugar a tinciones policromas. Los colorantes de tipo Romanowsky son mezclas que constan de un colorante ácido (eosina) y de colorantes básicos (tiacinas).

- Tinciones fluorescentes, emplean colorantes (fluorocromos) que se fijan a las células y que cuando son estimulados por una luz ultravioleta, emiten una radiación visible de un color característico, los fluorocromos más utilizados en esta clase de tinciones son el naranja de acridina y el rojo neutro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	82 /284

- Tinciones citoquímicas, demuestran la presencia, más o menos abundante, o la ausencia de determinadas sustancias, localizadas en el interior de los gránulos citoplasmáticos de los leucocitos.

Denominación de las estructuras coloreadas

Las estructuras celulares pueden nombrarse de las siguientes formas:

- Estructuras acidófilas: son aquellas que fijan colorantes de naturaleza ácida, si el colorante ácido que captan es la eosina, se dice que son eosinófilas y adquieren un color rosado.
- Estructuras basófilas: son aquellas que fijan colorantes de naturaleza alcalina, adquieren un color azulado. Si tiñen de lila o púrpura con colorantes de tipo azul, se llaman azurófilas.

Material y Equipo

- Microscopio óptico
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asas bacteriológicas y micológicas
- Mechero
- Papel seda
- Lanceta estéril
- Hisopo estéril
- Alcohol al 70%



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	83 /284

Material Biológico

- Cepas Bacterianas
- Material orgánico contaminado que contenga hongos (fruta, queso, pan, etcétera)
- Planta acuática *Elodea sp*
- Agua de pecera, agua estancada o de un florero

Reactivos

- Colorante de Giemsa
- Colorantes de Gram
 - Cristal violeta:
 - Solución A. cristal violeta 10g y alcohol de 95% 100 mL.
 - Solución B. oxalato de amonio: 10 g y agua destilada 1000 mL.
 - Solución C. solución A 100 mL + solución B 800 mL.
 - Yodo para Gram (Lugol): disolver 1 g de yoduro de potasio en 70 mL de agua destilada, agregar 0.5g de yodo y completar hasta 100 mL. Agitar y disolver completamente.
 - Alcohol- Acetona: acetona 30 mL+alcohol de 95% 70 mL.
 - Safranina: Safranina 1.0 g en 100 mL de agua destilada.
- Azul de metileno
- Colorante de Wright
- Metanol
- Agua destilada
- Aceite de inmersión



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	84 /284

Método

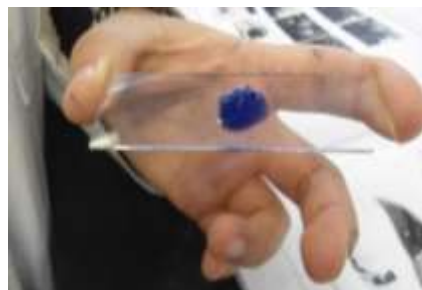
Realizar las siguientes preparaciones y observaciones utilizando la técnica de enfoque del microscopio descrita en la práctica del Microscopio óptico.

1. Levaduras

Colocar una pequeña porción de levaduras en un tubo de ensaye y adicionar agua. Tomar una gota y colocarla en un portaobjetos.



Colocar una gota de azul de metileno y colocar el cubreobjetos. Realizar la observación al microscopio con objetivos 10X y 40X.



2. Hongos

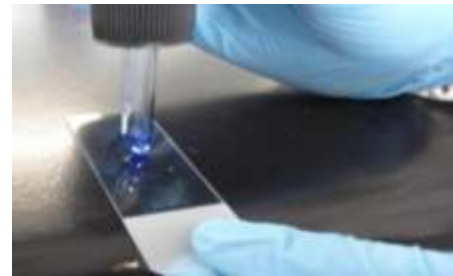
Colocar en un portaobjetos una gota de agua, tomar cuidadosamente con el asa bacteriológica poco de los hongos que se encuentran sobre los alimentos contaminados y colocarlos sobre la gota de agua.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	85 /284

Colocar una gota de azul de metileno y el cubreobjetos. Realizar la observación al microscopio con los objetivos 10X y 40X.



Planta *Elodea* sp

En un portaobjetos colocar una gota de agua y una hoja de la planta, cubrir con un cubreobjetos.



Observar al microscopio con los objetivos 10X y 40X.

Identificar las estructuras: pared celular, membrana plasmática, cloroplastos.





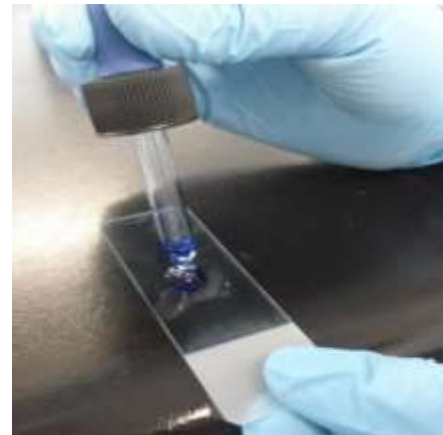
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	86 /284

4. Células de descamación

En un portaobjetos, colocar una gota de agua y utilizando un hisopo frotar el interior de la mejilla, mezclar la muestra tomada con la gota de agua.



Adicionar una gota de azul de metileno y cubrir con un cubreobjetos. Observar la muestra al microscopio objetivos 10X y 40X.



5. Protozoarios

En un portaobjetos, colocar una gota de agua estancada. Colocar un cubreobjetos.

Observar la muestra al microscopio, objetivos 10X y 40X.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	87 /284

6. Bacterias (Tinción de Gram)

Realizar un frotis de las distintas cepas bacterianas siguiendo las instrucciones del asesor. Dejar secar y fijar al calor.



Teñir el frotis agregando cristal violeta durante 1 minuto. Enjuagar con agua





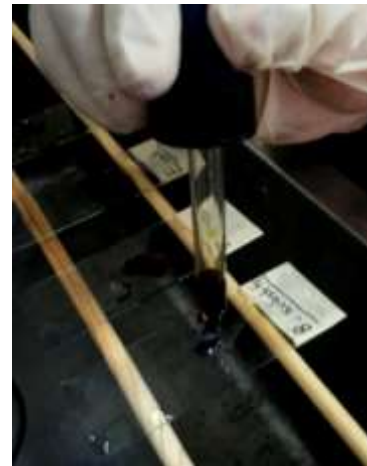
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	88 /284

Agregar lugol y dejarlo durante 1 minuto. Enjuagar con agua



Enjuagar con alcohol-acetona para quitar exceso de colorante durante unos segundos.



Adicionar el colorante safranina y dejarlo actuar durante 1 minuto, enjuagar con agua y dejar secar el frotis. Realizar la observación de los frotis utilizando el objetivo 100X, utilizar aceite de inmersión.

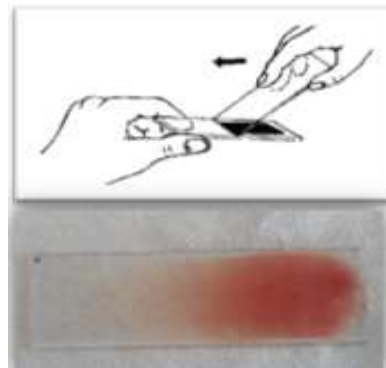




Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	89 /284

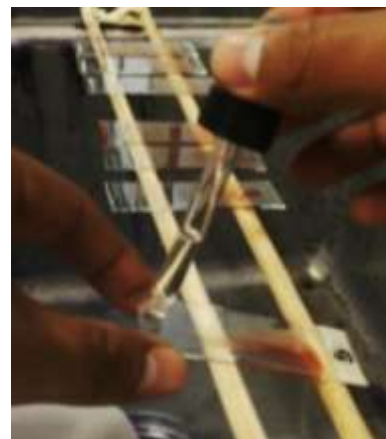
7. Células sanguíneas

Tomar una muestra de sangre mediante la punción de la yema de dedo con una lanceta.



Realizar un frotis sanguíneo con la ayuda de otro portaobjetos, dejando una fina capa extendida en el portaobjetos.

Dejar secar la sangre y fijar con metanol durante 6 minutos





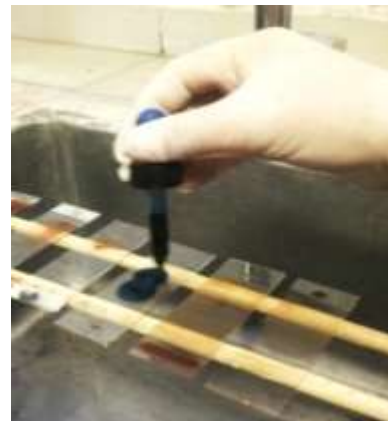
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	90 /284

Teñir con colorante Giemsa durante 15 minutos
(dilución 39:4 con agua), enjuagar con agua.



Observar la muestra al microscopio con el objetivo
100X, utilizar aceite de inmersión.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	91 /284

Resultados

Realizar los esquemas de las observaciones realizadas, indicando el aumento del objetivo utilizado, el tipo de tinción y las estructuras que se observaron. NO DIBUJAR EL CAMPO VISUAL DEL MICROSCOPIO. Comparar con referencias bibliográficas lo observado.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram y para qué sirve cada uno de los reactivos que se utilizan?
3. ¿Qué estructuras celulares tiñe el azul de metileno?
4. ¿Cómo se realiza un frotis sanguíneo?
5. ¿Cuáles son las estructuras de los hongos que se pueden observar en el microscopio?
6. ¿Cómo se diferencian los distintos tipos de células sanguíneas en un frotis?
7. Menciona 5 ejemplos de células eucariotas, y 5 ejemplos de células procariotas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	92 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Campal F. Espinosa B. Carrasco M. Fundamentos y Técnicas de Análisis Hematológicos y Citológicos. Madrid: Parainfo S.A.; 2004.
3. García V. Introducción a la microbiología. 2ª ed. Costa Rica: EUNED; 2004.
4. Gustavo L. Biología celular y molecular. 2ª ed. Colombia: Universidad de la Sabana; 2010.
5. Koolman J. Bioquímica: Texto y atlas, 13ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2004.
6. Maillet M. Biología Celular. México: Masson S.A.; 2002.
7. Navarro C. Cirugía oral. España: Aran; 2008.
8. Negrori M. Microbiología estomatología: fundamentos y guía práctica. 2ª ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2009.
9. Thibodeau P. Estructura y función del cuerpo humano. 13ª ed. Barcelona: Elsevier mosby; 2008.
10. Villafañe H. Microbiología básica para el área de la salud y afines. 2ª ed. Colombia: Universidad de Antioquina; 2008.
11. Wayne M. Becker J. Kleinsmith J. El mundo de la célula, 6ª ed. Madrid: Pearson PLC; 2007.
12. Werner M. Bioquímica fundamentos para medicina y ciencias de la vida. Barcelona: Reverté; 2008.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	93 /284

PRINCIPALES CONSTITUYENTES QUÍMICOS DE LA MATERIA VIVA

Objetivos

- ✓ Analizar la importancia del agua como el constituyente más abundante de la materia viva.
- ✓ Cuantificar el contenido de minerales en una muestra biológica.
- ✓ Identificar lípidos y proteínas de diferentes tejidos de la rata.
- ✓ Comparar los contenidos de proteínas, lípidos y humedad de diferentes tejidos de la rata.
- ✓ Aprender el manejo de la rata como animal de experimentación.

Antecedentes académicos

- ✓ La importancia del agua en los seres vivos.
- ✓ Los minerales y sus funciones en los seres vivos.
- ✓ Composición, propiedades, función y distribución de las Biomoléculas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	94 /284

Introducción

Los principales constituyentes de la materia viva son agua, proteínas, lípidos, minerales, ácidos nucleicos y carbohidratos. El componente más abundante de los seres vivos es el agua con un promedio en el peso húmedo de 60% y su determinación permite comparar los resultados obtenidos con base a peso seco de cualquier muestra. El agua es el disolvente de la mayoría de los compuestos biológicos y sin ella no podría existir la vida. Después del agua, los componentes de la materia viva más abundantes son las proteínas presentes en promedio del 17% del peso de un organismo.

Las proteínas proporcionan soporte para muchas estructuras y son claves en el metabolismo, haciendo funciones de transporte, señalización, y comunicación, entre otras. Son las unidades estructurales básicas de la arquitectura celular que dan a la célula y organelos su forma y aspecto. Además, catalizan la mayoría de las reacciones químicas del organismo, las cuales comprenden tanto los procesos de síntesis como los de degradación de las moléculas orgánicas.

Con similar abundancia en los seres vivos que las proteínas (15%), los lípidos son biomoléculas cuya característica en común es la de ser insolubles en agua y solubles en disolventes no polares. Los más abundantes y más ampliamente distribuidos son los triglicéridos. Es común clasificarlos en lípidos complejos o saponificables (acilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras) y simples o insaponificables (terpenos, esteroides y prostaglandinas). Además de ser reserva de energía almacenados como grasa, proporcionan protección como ceras, conforman la estructura básica de las membranas biológicas y poseen actividades importantes en el metabolismo como segundos mensajeros.

En menor cantidad (5%) pero sumamente importantes son los minerales como Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{++} , Mn^{++} y Mg^{++} . Las funciones de los minerales en el cuerpo son muy variadas; por ejemplo, la formación de la sustancia cristalina



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	95 /284

de los huesos, la participación como cofactores de muchas enzimas y la generación de corriente eléctrica en los nervios y células musculares. La mayoría de estas funciones dependen del hecho de ser estos iones, partículas relativamente pequeñas y de una gran carga eléctrica.

Los ácidos nucleicos presentes en los organismos vivos (2% en promedio) son el ribonucleico (ARN) y el desoxirribonucleico (ADN). Entre sus funciones biológicas se encuentran el almacenamiento, replicación, recombinación y transmisión de información genética.

Aunque son los menos abundantes (1%), los carbohidratos son la principal sustancia alimenticia para la mayoría de los organismos. Se encargan de proporcionar la mayor parte de la energía y el carbono necesarios para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros carbohidratos.

Material y Equipo

- Estuche de disección
- Crisoles
- Tabla de disección
- Mechero
- Pinzas para crisol
- Charolas de papel aluminio de 2 X 2 cm
- Desecador
- Tela de asbesto
- Soporte universal y anillo de hierro
- Mortero con pistilo
- Tubos de 13 X 100 mm y 16 X 100 mm
- Centrífuga
- Mufla
- Vasos de precipitados de 50 mL



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	96 /284

Reactivos

- Cloroformo
- Solución salina isotónica de NaCl al 0.9%
- Etanol 96°
- Peróxido de hidrógeno
- Metanol

Material Biológico

- Rata Wistar de 200 g de peso

Método

1 Preparación de la muestra.

- Sacrificar la rata Wistar de 200 g de peso mínimo, mediante anestesia con cloroformo en un frasco cerrado.
- Colocar la rata muerta en la tabla de disección y amarrarle cada una de sus patas a las esquinas correspondientes de la tabla de disección (Fig.1A).
- Con la ayuda del estuche de disección; disectar los siguientes órganos: hígado, cerebro, corazón, riñón y bazo (Fig.1B).
- De cada órgano tomar cinco porciones:
 - Dos de aproximadamente 0.3 g que serán colocadas respectivamente en dos crisoles marcados, puestos previamente a peso constante para determinar cenizas.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	97 /284

- ii. Dos porciones, también de aproximadamente 0.3 g que se colocarán en charolas de papel aluminio marcadas y previamente a peso constante, para determinar humedad.
- iii. La última porción, de aproximadamente 1 g, será colocada directamente en un mortero para la extracción e identificación de lípidos y proteínas.

2. Cuantificación de humedad.

- a. Pesar las dos porciones de tejido colocadas en las respectivas charolas de papel aluminio (previamente puestas a peso constante).
- b. Determinar el peso exacto de la muestra por diferencia de pesos; es decir, el peso de la charola de aluminio con muestra menos el peso de la charola de aluminio sin muestra.
- c. Agregar a cada muestra 1 mL de etanol 96°.
- d. Colocar en la estufa a 100-110° C durante 90 minutos, enfriar en desecador y pesar.
- e. Calcular el % de humedad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	98 /284

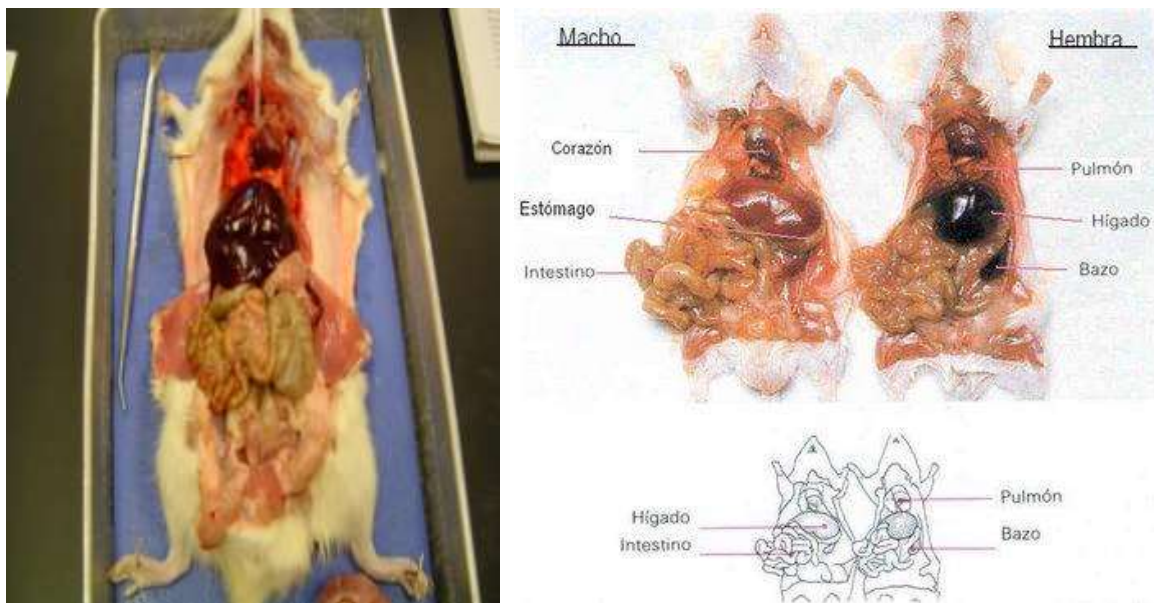


Fig. 1. Colocación de la rata (A) y posición de órganos de rata Wistar (B).

3. Cuantificación de cenizas.

- Calcinar las muestras colocadas en los crisoles con la flama de un mechero Fisher (Figura 2), hasta que se obtengan cenizas blancas o grises y sin residuos visibles de carbonización (si se observan puntos negros, se humedecen con unas gotas de peróxido de hidrógeno y se vuelven a calcinar).



Fig. 2. Calcinación de muestra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	99 /284

- b. Colocar los crisoles en la mufla y calentar hasta alcanzar una temperatura de 500° C, mantenerlos a esta temperatura un mínimo de 40 minutos o hasta que las cenizas estén completamente blancas o grises, de no ser así humedecer nuevamente con peróxido de hidrógeno y volver a calcinar en la mufla.
- c. Enfriar los crisoles y pesar (Fig. 3).
- d. Calcular el % de cenizas*.

De manera optativa pueden determinarse en las muestras la presencia de cationes sodio, amonio, potasio y calcio y aniones sulfuros, cloruros, yoduros, cianuros y fosfatos.



Fig. 3. Desecador con muestras.

4. Identificación de Lípidos y Proteínas.

- a. Triturar severamente con arena tratada o con vidrio molido la porción de muestra que fue colocada en un mortero (Fig.4).



Fig. 4. Homogenización del tejido.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	100 /284



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	101 /284

Agregar a la muestra 10 mL de cloroformo-metanol 2:1 v/v.

- b. Homogeneizar y vaciar en un vaso de precipitados de entre 20 y 50 mL. Agregar otros 5 mL al mortero, de cloroformo-metanol 2:1 v/v con la finalidad de lavar los restos de tejido, homogenizar y colocar en el mismo vaso. Pasar la mezcla a tubos de ensayo de 13 X 100 mm y centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
- c. Separar los sobrenadantes en un vaso de precipitados de 50 mL limpio.
- d. Agregar 10 mL de agua destilada al vaso de los sobrenadantes y dejar reposar 10 minutos. Con esto se separarán la fase clorofórmica (lípidos), de la fase acuosa (proteínas).
- e. Identificación de proteínas.-

Tomar una alícuota (1 mL) de la fase acuosa y determinar proteínas según el método de Lowry utilizado en la práctica de curva estándar.

- f. Identificación de lípidos.-

Tomar una alícuota de la fase clorofórmica (1 mL) e identificar colesterol según el método de Liebermann-Burchard: añadir 15 gotas de anhídrido acético al tubo; mezclar, dejar enfriar y finalmente añadir 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observar la coloración de la reacción. **Nota:** Esta reacción es altamente exotérmica por lo que se debe efectuar con guantes y lentes de seguridad en una campana de extracción.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	102 /284

Resultados

- Realice sus cálculos para obtener el % de humedad y % de cenizas (con base al peso seco).
- Mediante cruces (+) comparar lo obtenido para cada órgano indicando el grado de reacción en la identificación de lípidos y proteínas.
- Elabore en el pizarrón un cuadro comparativo con los resultados obtenidos de humedad, cenizas, proteínas y lípidos para cada órgano.
- Compare los resultados del cuadro con la bibliografía y discuta sus resultados.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia biológica del agua en un ser vivo?
2. ¿Cuál es la función de cada uno de los minerales presentes en una muestra?
3. ¿En qué tejido esperarías encontrar mayor cantidad de lípidos? ¿Por qué?
4. ¿Cómo calcula el % de humedad de una muestra?
5. ¿Cómo calcula el % de cenizas de una muestra?
6. Para cada biomolécula, mencione en forma breve su composición, así como su función.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	103 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
3. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	104 /284

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE RESERVA EN ANIMALES Y PLANTAS

Objetivos

- ✓ Analizar la importancia biológica de los carbohidratos de reserva.
- ✓ Extraer polisacáridos de muestras diferentes.
- ✓ Identificar a éstos con la prueba de lugol y Benedict, antes y después de su hidrólisis.

Antecedentes académicos

- ✓ Composición química de los carbohidratos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los carbohidratos.
- ✓ Funciones de los carbohidratos en la célula y en un organismo intacto.
- ✓ Pruebas para la identificación de carbohidratos



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	105 /284



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	106 /284

Introducción

Los carbohidratos son compuestos orgánicos químicamente formados por la unión de átomos de Carbono (C), Hidrógeno (H) y Oxígeno (O), dispuestos en formas específicas. Se obtienen como producto de la fotosíntesis que se realiza en las plantas. Los únicos carbohidratos de origen animal son: la lactosa (presente en la leche de los mamíferos) y el glucógeno (presente en hígado y músculos).

Entre las principales funciones que cumplen los carbohidratos en el organismo humano, están:

- Aportar energía de utilización inmediata en forma de glucosa.
- Constituir una reserva energética en forma de glucógeno. Si el exceso de carbohidratos es desmedido, entonces la reserva se incorpora en forma de grasa corporal.
- Aportar la fibra necesaria para el normal funcionamiento del sistema digestivo.

Los carbohidratos de reserva son básicamente mono-, di- y polisacáridos, siendo el almidón el más importante en las plantas de origen tropical.

Los polisacáridos son carbohidratos de elevado peso molecular que mediante hidrólisis se desdoblan en un gran número de restos de monosacáridos, ejemplo de éstos son la celulosa, el glucógeno y el almidón.

El glucógeno se almacena en el hígado principalmente formando hasta el 10% del peso húmedo, es un material de reserva que puede mantener el nivel de glucosa en sangre durante 12 a 24 horas. Su peso molecular va de 1×10^6 a 1×10^8 Daltons. Está formado por monómeros de glucosa, unidos mediante enlaces alfa (1-4) y enlaces laterales alfa (1-6) en las ramificaciones,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	107 /284

presenta estructura en forma de abanico (Fig. 1). Es soluble en agua y con el I_2 da una coloración café pardo.

El almidón es el material de reserva de la mayoría de las plantas, existen dos formas de almidón: la amilosa y la amilopectina. La amilosa es soluble en agua y está formada por cadenas lineales de D-glucosa con enlaces alfa (1-4) y la amilopectina además de ser insoluble en agua, se encuentra ramificada por cadenas de D-glucosa iguales a las anteriores pero que se unen entre sí por enlaces cruzados alfa (1-6), la separación entre cada ramificación es de 19 a 26 unidades de glucosa aproximadamente. La amilosa presenta una conformación helicoidal y en presencia de I_2 toma una coloración azul, en cambio la amilopectina debido a sus ramificaciones retiene menos I_2 , dando una coloración café pardo.

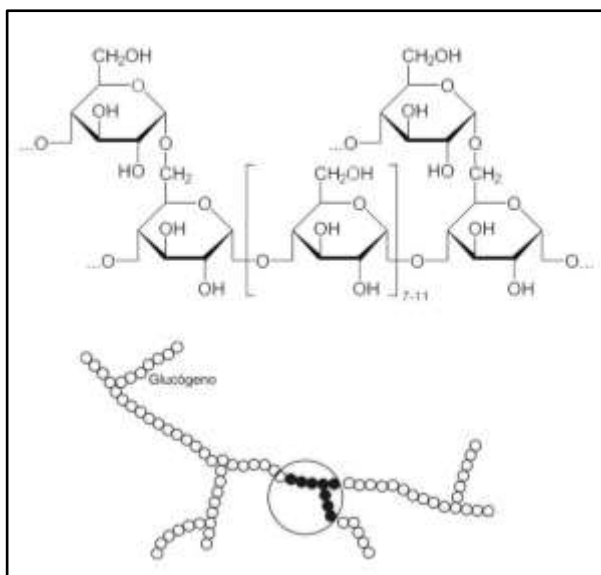


Fig.1. Estructura del glucógeno



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	108 /284

Material y Equipo

- Estuche de disección.
- Tabla de disección
- Gradilla
- Tubos de ensaye de 13 X 100
- Papel filtro de poro abierto
- Embudo
- Vidrio de reloj
- Mortero con pistilo
- Perlas de ebullición
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL
- Soporte universal
- Anillo de hierro
- Pipetas de 1 y 5 mL
- Goteros
- Parrilla
- Centrífuga

Reactivos

- Ácido acético
- HCl concentrado
- Etanol 96°
- NaOH solución concentrada
- Lugol: añada I₂ a una solución saturada de yoduro de potasio en agua, filtre y diluya con agua destilada hasta obtener una solución de color pardo dorado, consérvelo en frasco ámbar.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	109 /284

- Reactivo de Benedict: disuelva 17.3 g de sulfato de cobre pentahidratado en 100 mL de agua caliente. Por separado disuelva 173 g de citrato de sodio anhidro en 800 mL de agua fría. Vierta ésta última solución en la primera y complete a un volumen de 1000 mL con agua destilada.

Material Biológico

- Rata Wistar de 200 g de peso

Método

Experimento 1

1. Sacrificar una rata Wistar de aproximadamente 200 g de peso.
2. Colocar la rata muerta en la tabla de disección y amarrarle cada una de sus patas a las esquinas correspondientes de la tabla de disección.
3. Realizar la disección del hígado con ayuda del estuche de disección.
4. Cortar el hígado por la mitad y colocarlo en un vidrio de reloj; de aquí en adelante ésta será la porción de hígado que se utilizará.
5. Cortar la porción de hígado en trozos medianos y colóquelos en 80 mL de agua destilada a temperatura de ebullición y manténgalo así por 4 minutos.
6. Pasar el tejido a un mortero y tritúrelo con arena fina (Fig. 2).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	110 /284



Fig.2. Trituración del hígado con arena fina

7. Colocar el homogenizado en la misma agua y déjelo hervir durante 15 minutos. Acidifique agregando ácido acético hasta un pH de 4 a 5.
8. Filtrar en caliente (nótese la opalescencia del filtrado) (Fig. 3) y agregar al filtrado su mismo volumen de etanol al 96% frío. Dejar reposar la suspensión en refrigeración durante 24 horas.



Fig.3. Filtración en caliente



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	111 /284

9. Sin resuspender, decantar el líquido y centrifugar el sedimento a 2000 rpm, durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante y depositar el precipitado en un vidrio de reloj. Dejar secar a temperatura ambiente.
10. Disolver una cantidad de glucógeno en 4 mL de agua. En 2 tubos de ensaye colocar 0.5 mL de esta solución, en uno de ellos añadir 2 gotas de lugol y en el otro 0.5 mL del reactivo de Benedict, en el caso de esta última prueba se requiere colocar los tubos a ebullición en baño maría.
11. Preparar 2 tubos más con 0.5 mL de agua destilada cada uno, en el primero adicione 2 gotas de lugol y en el segundo 0.5 mL de reactivo de Benedict, estos servirán como testigos negativos.
12. Para la Hidrólisis, agregar 3 gotas de HCl al resto de la solución y calentar a ebullición en baño maría durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, neutralizar con solución concentrada de NaOH utilizando papel pH como indicador.
13. Con la solución neutralizada, realizar nuevamente las pruebas de Lugol y Benedict y comparar los resultados antes y después de la hidrólisis (Fig.4).



Fig. 4. Resultados de pruebas de Lugol y Benedict para glucógeno y glucógeno hidrolizado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	112 /284

Experimento 2.

Corte una papa en rodajas, adicione lugol y observe la coloración (fig. 5).



Fig.5. Adición de lugol.

Experimento 3.

1. Colocar unos granos de arroz molido en agua caliente. Obtener un extracto de almidón.
2. Tomar dos alícuotas de 0.5 mL de este extracto y realizar las pruebas de lugol y Benedict.
3. Para la Hidrólisis, tomar 2 mL del extracto y agregar 3 gotas de HCl calentar a ebullición en baño maría durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, neutralizar con solución concentrada de NaOH utilizando papel pH como indicador.
4. Con la solución neutralizada, realizar nuevamente las pruebas de Lugol y Benedict y comparar los resultados antes y después de la hidrólisis (Fig. 6).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	113 /284

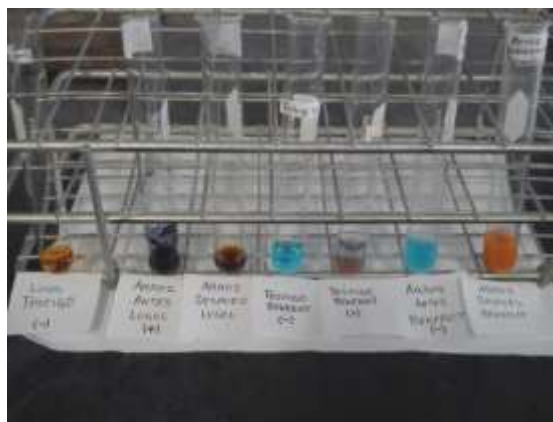


Fig. 6. Resultados de pruebas de Lugol y Benedict para almidón y almidón hidrolizado.

Resultados

- Realizar un cuadro con los resultados obtenidos para las pruebas de lugol y Benedict en cada una de las muestras analizadas.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las propiedades del glucógeno que se aprovechan para su extracción?
2. ¿Cuál es el fundamento de la reacción de Benedict y a qué se deben sus resultados antes y después de la hidrólisis?
3. ¿Cuál fue el polisacárido identificado en los experimentos 2 y 3? Mencione sus diferencias con respecto al glucógeno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	114 /284

4. ¿Qué es un azúcar reductor?
5. ¿Puede un polisacárido ser reductor? ¿Por qué?
6. ¿En qué otros tejidos se puede encontrar glucógeno?

Referencias

1. Acuña F. Química Orgánica. Costa Rica: UENED; 2006.
2. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
3. Campbell MK, Farrell SO. Bioquímica. 6a ed. México DF: Cengage Learning; 2010.
4. Clark JM. Bioquímica experimental. Madrid: Acribia; 1996.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Stryer L, Berg JM, Timoczko JL. Bioquímica. 6ª ed. Barcelona, España: Editorial Reverté. 2008.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	115 /284

EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO

Objetivos

- ✓ Analizar las propiedades de los lípidos.
- ✓ Extraer los lípidos de la yema de huevo.
- ✓ Cuantificar fosfatos de lípidos fosforilados y no fosforilados.
- ✓ Analizar la importancia biológica de los lípidos presentes en la yema de huevo.

Antecedentes académicos

- ✓ Definición y clasificación de los lípidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los lípidos.
- ✓ Métodos de extracción e identificación de lípidos.
- ✓ Métodos de cuantificación de fósforo.
- ✓ Componentes lipídicos de la yema de huevo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	116 /284

Introducción

Los lípidos representan uno de los cuatro grupos principales de macromoléculas presentes en todas las células. Llevan a cabo múltiples funciones en el organismo, como: almacenamiento de energía, transporte, estructura, especialmente en membranas, confiriéndoles la propiedad de permeabilidad selectiva, al permitir el paso o no de algunas sustancias y en determinada dirección, así como la conducción nerviosa y el transporte activo como la bomba de Na^+/K^+ . Además, actúan como hormonas y algunas vitaminas. A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas y los polisacáridos, los lípidos no son poliméricos. Sin embargo, se agregan, y es en este estado en el que llevan a cabo su función estructural en las membranas biológicas.

Los lípidos exhiben mayor variedad estructural que las otras clases de macromoléculas biológicas. Hasta cierto grado, los lípidos son una categoría general de sustancias similares únicamente por ser en gran medida hidrófobas y sólo escasamente solubles en agua. En general, los lípidos llevan a cabo tres funciones biológicas:

1. Ser componentes esenciales de las membranas biológicas.
2. Servir como depósitos de energía.
3. Participar en numerosos acontecimientos de señalización intra e intercelular.

Debido a su naturaleza hidrófoba los lípidos son fáciles de separar de otros materiales biológicos mediante extracción con disolventes orgánicos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	117 /284

Propiedades fisicoquímicas de los lípidos

Los lípidos son insolubles en agua, cuando se agitan fuertemente en ella se dividen en gotas formando una emulsión que es transitoria, pues desaparece en reposo por reagrupación de las gotitas de grasa en una capa que, por su menor densidad, se sitúa sobre el agua. Por el contrario, son solubles en disolventes orgánicos, como éter, cloroformo, acetona, benceno, etc. Su solubilidad en alcoholes dependerá del tamaño de él mismo, así como de su ramificación (a mayor número de carbonos más soluble será el lípido no así con la ramificación).

Fosfolípidos

Los fosfolípidos, son moléculas anfipáticas que contienen un alcohol (glicerol), dos ácidos grasos y un grupo fosfato (Fig. 1). Son los componentes lipídicos principales de las membranas biológicas. Se organizan como glicerol-3-fosfato y las posiciones C_1 y C_2 están esterificadas con ácidos grasos, comúnmente uno saturado y otro insaturado con una longitud promedio de 18 carbonos. Adicionalmente, el grupo fosforilo está unido a un hidrógeno (ácido fosfatídico) o a otro grupo, en general polar (Cuadro 1).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	118 /284

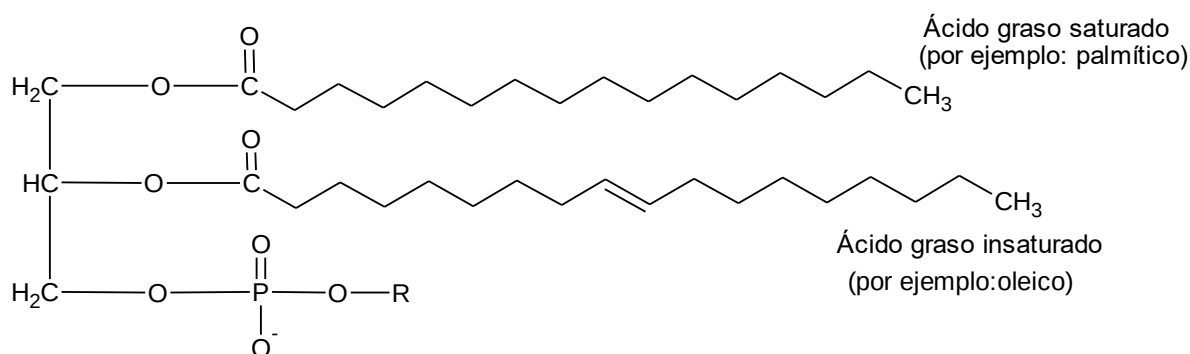


Fig. 1. Glicerofosfolípido.

Cuadro 1. Sustituyentes en el glicerofosfolípido.

R	Estructura de R	Nombre
Hidrógeno	$\text{H}-\text{H}$	Ácido fosfatídico
Etanolamina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina
Colina	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina
Serina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{COOH})-\text{H}$	Fosfatidilserina

Los fosfolípidos son componentes estructurales importantes de las membranas, varios fosfolípidos son agentes emulsionantes y agentes superficiales activos (un agente superficial activo es una sustancia que



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	119 /284

disminuye la tensión superficial de un líquido, normalmente el agua, de forma que se dispersa por una superficie).

Pueden realizar estas funciones ya que son anfipáticos, esto es que son simultáneamente hidrofílicos e hidrofóbicos. Es la parte hidrofílica donde se encuentran el grupo fosfato y el aminoalcohol o base nitrogenada. Esta característica estructural hace posible que los fosfolípidos participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y el sistema lipídico separando y aislando a los dos sistemas, a la vez que los mantiene juntos.

Cuando los fosfolípidos se suspenden en agua, se reagrupan espontáneamente en estructuras ordenadas, los grupos hidrófobos quedan enterrados en el interior para excluir el agua, simultáneamente, los grupos de cabeza polar se orientan de forma que se exponen al agua. Cuando están presentes las moléculas de fosfolípidos en una concentración suficiente, forman capas bimoleculares. Esta propiedad de los fosfolípidos es la base de la estructura de la membrana (Fig. 2).



Fig. 2. Moléculas de fosfolípidos en solución acuosa.

La fosfatidilcolina (lecitina), es el fosfolípido más abundante de la yema de huevo, por lo que se toma como referencia para analizar las propiedades y cuantificar los lípidos presentes en la yema de huevo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	120 /284

La yema de huevo es una fuente rica en lípidos, en el cuadro 2 se muestra el contenido de los principales fosfolípidos en ella.

Cuadro2.Contenido de fosfolípidos en
100g de yema de huevo

Fosfolípidos totales	10.34 g
Fosfatidilcolina	6.79 g
Fosfatidiletanolamina	1.93 g
Fosfatidilinositol	64.00 mg
Esfingomielina	488.00 mg

Digestión por el método de Kjeldahl

Este método fue desarrollado para separar el nitrógeno contenido en las proteínas y cuantificarlas de forma indirecta. En esta práctica debido a que el fósforo se encuentra en combinación con materia orgánica en los lípidos, la determinación de fósforo total debe necesariamente contemplar una oxidación efectiva de la materia orgánica.

Por lo anterior se calienta el compuesto que contiene fósforo con ácido sulfúrico concentrado, durante el proceso se agregan gotas de H_2O_2 el cual acelera la reacción. Se lleva a cabo la operación en matraces de cuello largo (matraces Kjeldahl) sobre un digestor de alto calentamiento.

Los compuestos orgánicos se carbonizan por la acción del ácido sulfúrico, los elementos carbono, hidrógeno, fósforo y azufre son oxidados a CO_2 , CO , H_2O , $\text{P}_2\text{O}_7^{-4}$ y SO_2 . El abundante desprendimiento de dióxido y trióxido de azufre exige efectuar el proceso en la campana de extracción. Se continua la digestión hasta que la muestra reaccionante sea completamente incolora.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	121 /284

Determinación de fósforo por el método de Fiske & Subbarow

Se utiliza este método con la finalidad de cuantificar el fósforo contenido en los lípidos de la muestra. Los iones fosfato reaccionan con el molibdato de amonio en medio ácido para producir el complejo fosfomolibdato de amonio, el cual, en presencia de un agente reductor, produce un complejo heteropolimérico de color azul, azul de molibdeno, cuya absorbancia se mide a los 615 nm. La intensidad de color es proporcional a la concentración de fósforo de la muestra.

Material y Equipo

- Anillo de hierro
- Embudo de separación de 125 mL
- Embudo de tallo corto
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Matraces aforados de 10, 50 y 100mL
- Matraces MicoKjeldahl de 30 mL
- Micropipetas. p200, p1000 y p5000 μ L
- Papel filtro de poro grueso
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL 1/100
- Probetas graduadas de 25 y 100mL
- Puntas nuevas para las micropipetas
- Soporte universal
- Vasos de precipitados de 25, 50, 150 y 250 mL
- Baño maría
- Parrilla de calentamiento
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Celdas para espectrofotómetro



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	122 /284

Reactivos

- Reactivo 1: Con mucha precaución añadir 26 mL de H_2SO_4 concentrado en 70 mL de agua destilada (enfriar con flujo de agua en la parte externa del recipiente), posteriormente agregar y disolver 2.5 g de molibdato de amonio, completar a 100 mL con agua destilada.
- Reactivo 2: Disolver en agua: 14 g de bisulfito de sodio, 0.5 g de sulfito de sodio, 0.25 g de ácido 1 amino-2 naftol- 4 sulfónico, es importante disolver en ese orden y no agregar el siguiente reactivo hasta que se disuelva el anterior, finalmente llevar a 200 mL con agua destilada. Conservar en refrigeración donde es estable durante 2 semanas.
- Solución estándar de fosfato: Disolver 0.4394 g de fosfato monopotásico en agua destilada y aforar a 1000 mL con agua (Solución Stock). Posteriormente realizar una dilución 1:10 de la solución Stock.
- Mezcla cloroformo-Metanol 2:1 V/V
- Acetona
- Cloruro de sodio al 1 %
- Sulfato de sodio anhidro
- Éter de petróleo
- Ácido sulfúrico
- H_2O_2 al 30%
- Hidroxiquinona
- NaOH 1N



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	123 /284

Material Biológico

-Huevo de gallina

Método

Extracción y separación de fosfolípidos y lípidos no fosforilados.

1. Romper un huevo de gallina a la mitad y separar la clara de la yema utilizando un desyemador.
2. Pasar la yema a un vaso de precipitados de 250 mL, adicionar 90 mL de una mezcla de disolventes: cloroformo-metanol 2:1 V/V, agitar suavemente mezclando bien la yema con el disolvente. Dejar reposar 10 minutos.
3. Filtrar el homogenizado a través de un filtro de poro grueso. Dividir el filtrado en dos partes para que sea utilizado por dos equipos de trabajo y continuar.
4. Colocar el filtrado en un embudo de separación con 25 mL de solución acuosa de NaCl al 1 %, invertir cuidadosamente dos veces el embudo para lavar el filtrado y dejar reposar 10 minutos para permitir la separación de ambas fases. Finalmente obtener sólo la fase clorofórmica.
5. Eliminar el agua que pueda haber en la fase clorofórmica mediante la adición de aproximadamente 2g de Na_2SO_4 anhidro, agitar vigorosamente y filtrar. En caso de que la solución continúe turbia, repetir la operación



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	124 /284

6. Evaporar el disolvente en baño maría, hasta que se observe un residuo espeso, sin olor a disolvente adicionar 15 mL de acetona fría y colocar en baño de hielo.
7. Lavar precipitado (lípidos fosforilados) con 5 mL de acetona fría, eliminar el disolvente por decantación y disolver en 10 mL de éter de petróleo. Guardar en un frasco ámbar, etiquetar y guardar en refrigeración.
8. Evaporar la solución cetónica (lípidos no fosforilados) en baño maría y disolver en 10 mL de éter de petróleo.

Precaución: Etiquetar bien sus recipientes y adicionar trazas del antioxidante hidroxiquinona para guardar las muestras. Guardar en refrigeración.

Determinación del contenido de fósforo en fosfolípidos y lípidos no fosforilados.

1. Evaporar las dos soluciones etéreas a sequedad en baño maría.
2. Pesar en dos papeles filtro pequeños, 10 mg de fosfolípidos y lípidos no fosforilados. Colocar los papeles en dos matraces microkjedahl y digerirlos con 1.0 mL de H_2SO_4 , adicionar durante el calentamiento gotas de H_2O_2 al 30 %. Continuar con la digestión hasta que el líquido se encuentre incoloro. Tener cuidado al momento de agregar el peróxido evitando que el matraz este muy caliente.
3. Aforar los líquidos resultantes a 50 mL con agua destilada.
4. Tomar alícuotas de 1 mL y neutralizar al tornasol con NaOH 1N y aforar a 10 mL con agua destilada.
5. Vaciar cada muestra a un vaso de precipitados de 25 mL y agregar a cada una 0.4 mL del reactivo de molibdato (reactivo 1), dejar reposar 10 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	125 /284

6. Agregar 0.2 mL del reactivo 2, dejar reposar 5 minutos.
7. Leer en el espectrofotómetro a 615 nm.

Curva estándar de fósforo

1. Tomar 5 alícuotas de la solución patrón de fosfatos: 0.2, 0.6, 1.0, 2.0, 3.0 mL respectivamente y aforar a 10 mL con agua destilada.
2. Para blanco de reactivos, se afora 10 mL de agua destilada.
3. Vaciar cada solución estándar a un vaso de precipitados
4. de 25 mL y agregar a cada uno 0.4 mL del reactivo de molibdato (reactivo 1), dejar reposar 10 minutos.
5. Agregar 0.2 mL del reactivo 2, dejar reposar 5 minutos.
6. Leer en el espectrofotómetro a 615 nm, utilizando el blanco de reactivos.

Resultados

- Graficar la curva estándar de fosfatos e interpolar las absorbancias de las muestras (fosforilados y no fosforilados).
- Tomar en cuenta las diluciones de las muestras para determinar la cantidad de fósforo en los lípidos fosforilados y no fosforilados; así como el porcentaje de fósforo presente en las muestras.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	126 /284

Cuestionario

1. Menciona 5 funciones de los lípidos en los organismos biológicos.
2. Explica el fundamento del método de Kjeldahl.
3. Justifica el uso de los disolventes cloroformo-metanol en la práctica.
4. Indica en qué consiste el método de cuantificación de fosfatos (Fiske & Subbarow) y su importancia para la práctica.

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Facultad de Química. UNAM. Licenciatura de Química en alimentos. Análisis de alimentos fundamentos y técnicas. [on line] Disponible en: dspace.universia.net/bitstream/2024/1067/1/ManualdeFundamentosyTécnicasdeAnálisisdeAlimentos_6501.pdf.
3. García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
4. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	127 /284

5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	128 /284

ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LÍPIDOS DE LA YEMA DE HUEVO POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Objetivos

- ✓ Identificar los lípidos de la yema de huevo, por medio de la técnica de cromatografía en capa fina.
- ✓ Estudiar los fundamentos de la cromatografía en capa fina.

Antecedentes académicos

- ✓ Clasificación de los lípidos.
- ✓ Componentes lipídicos de la yema de huevo.
- ✓ Fundamentos de la cromatografía en capa fina.
- ✓ Métodos de identificación de lípidos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	129 /284

Introducción

Los lípidos constituyen un complejo grupo de compuestos relacionados principalmente porque son insolubles en agua, solubles en disolventes no polares, como el éter, acetona, cloroformo, benceno y alcohol, y que se encuentran en tejidos animales y vegetales. Entre los muchos tipos de lípidos que existen podemos citar grasas, ácidos grasos, ceras, esteroides, fosfolípidos, glucolípidos y terpenos, como ejemplos de sustancias biológicamente importantes. Los lípidos presentes en los seres vivos pueden dividirse en dos grandes grupos, en función de sus estructuras químicas: simples y complejos.

A) Lípidos simples.

Los lípidos simples no contienen ácidos grasos por lo que no son saponificables y se derivan de moléculas de cinco carbonos. Los lípidos simples son:

- **Esteroides.** Los esteroides más comunes son el colesterol, los ácidos biliares y las hormonas sexuales en los vertebrados, la mayoría de los esteroides se encuentran como alcoholes libres o como ésteres de ácidos grasos de cadena larga. El esteroles más común es el colesterol, que es un componente de la membrana citoplasmática de los tejidos animales.
- **Terpenos.** Son constituyentes notables de ciertos vegetales, y a ellos se debe su olor y sabor característicos, éstos se sintetizan a partir de la acetilcoenzima A y son los precursores de los esteroides.
- **Prostaglandinas.** Moderadores de la actividad hormonal, son ácidos carboxílicos de 20 átomos de carbono, que contienen un anillo ciclopentano, grupos oxidrilo, uno o más dobles enlaces y en ocasiones un grupo cetona.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	130 /284

B) Lípidos complejos

Los lípidos son un grupo complejo contienen ácidos grasos y son saponificables, se dividen en triacilglicéridos, esfingolípidos, fosfoacilglicéridos y ceras.

Los ácidos grasos presentes en la naturaleza son cadenas de hidrocarburos no ramificadas con un grupo carboxilo en un extremo, éstos son sintetizados a partir de unidades de acetilo de dos carbonos. Cuando todos los átomos de carbono de una cadena de ácido graso están unidos por enlaces covalentes simples, el compuesto es “saturado”, un ácido graso “no saturado” tiene uno o más enlaces dobles entre los átomos de carbono del esqueleto de la cadena.

Los triacilglicéridos, llamados grasas neutras, son ester de alcohol glicerol y ácidos grasos, estos son la principal forma de almacenamiento de lípidos tanto en vegetales como en animales, pueden formarse a partir del exceso de carbohidratos, proteínas o lípidos en las células y tejidos (Fig. 1).

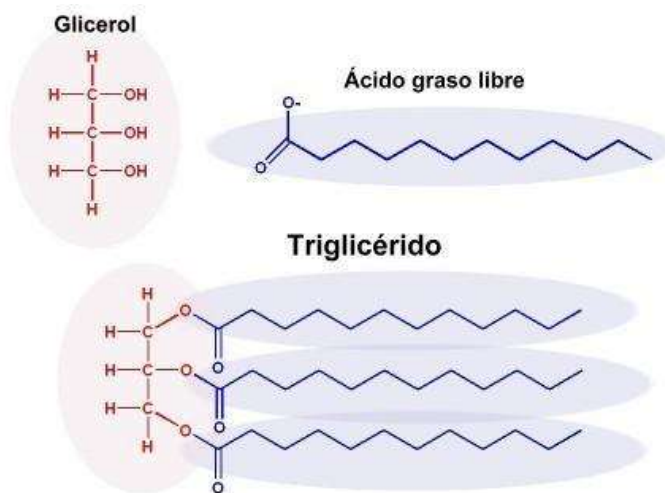


Fig.1. Estructura de triglicéridos (triacilglicéridos)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	131 /284

Los fosfolípidos son constituyentes importantes de las membranas celulares. En una molécula de fosfolípido, un ácido graso está unido a uno de dos grupos hidroxilo del glicerol y un residuo de ácido fosfórico lo está al tercer hidroxilo, en lugar de un tercer ácido graso, como en una grasa neutra (Fig.2). Así, todos los fosfolípidos tienen una “cola” hidrófoba que consta de dos cadenas de ácidos grasos y una “cabeza” hidrófila constituida por un residuo de ácido fosfórico cargado positivamente. Los fosfolípidos son, por lo tanto, moléculas anfipáticas, debido a que en la misma molécula existen las dos regiones: hidrófila e hidrófoba. Debido a su naturaleza anfipática, un fosfolípido puede actuar con fases acuosas y no acuosas y sirve así como enlace entre la célula y su entorno.

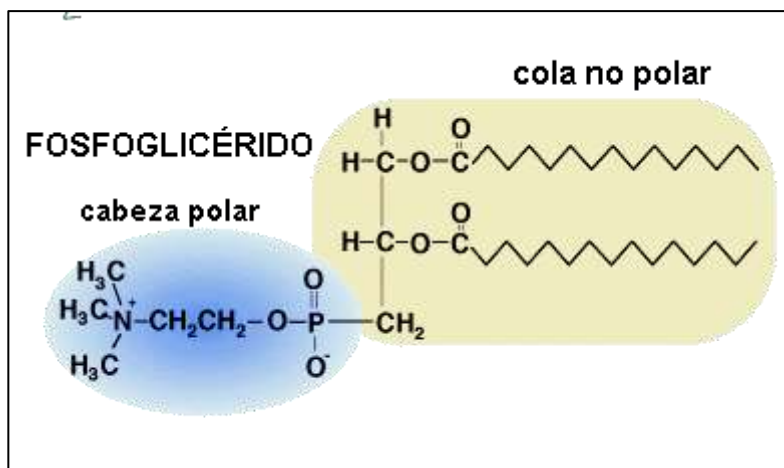


Fig. 2. Fosfolípido.

Cuando los fosfolípidos interactúan con agua, se congregan espontáneamente en dos capas, en dichas capas bimoleculares de fosfolípidos, las cabezas hidrófilas de las moléculas están en el agua y las colas hidrófobas son excluidas de ésta. Dichos agregados bimoleculares se asemejan notablemente a la disposición de los fosfolípidos en las membranas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	132 /284

celulares. Se parecen aún más a las membranas cuando una mezcla de proteínas y fosfolípidos se añade a un sistema con fase acuosa y aérea. Las propiedades anfipáticas de los fosfolípidos son muy importantes en la conformación de la membrana, así como en sus funciones en las interacciones que comprenden agua, lípidos y proteínas.

En medio acuoso las colas de los fosfolípidos se disponen de manera tal de formar un ambiente local hidrofóbico. Esto deja a los grupos fosfatos "de cara" al ambiente hidrofílico. Existen tres estructuras que los fosfolípidos pueden formar en razón de naturaleza anfipática (Fig. 3).

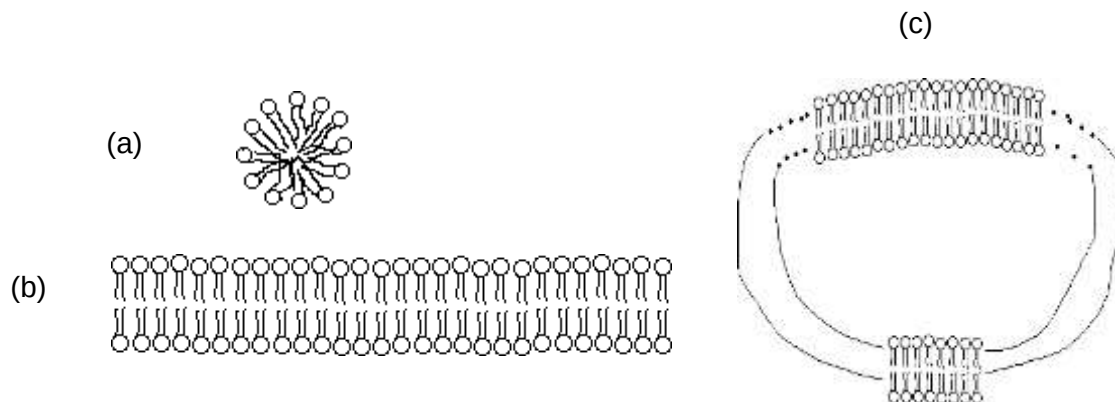
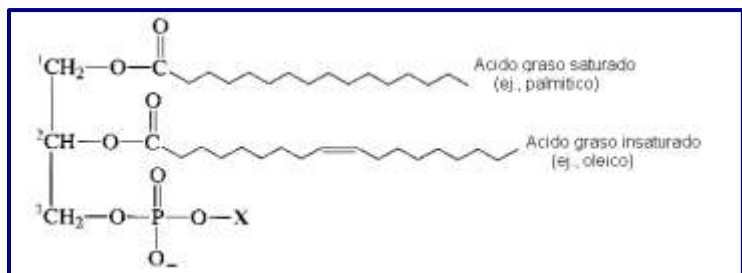


Fig 3. a) micelas, b) bicapas lipídicas, c) bicapas lipídicas esféricas liposomas.

Todos los fosfolípidos son derivados del ácido fosfatídico (Fig.4) y se nombran según sus grupos polares de cabeza (Fig.5). Todos tienen una carga negativa sobre el grupo fosfato a pH 7. El alcohol del grupo de cabeza también puede aportar una o más cargas a pH próximo a 7.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	133 /284

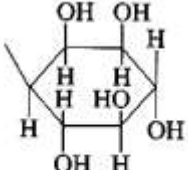
X	Estructura de X	Nombre de los Glicerofosfolípidos
(a) hidrógeno	$-\text{H}$	ácido fosfatídico
(b) etanolamina	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	fosfatidiletanolamina
(c) colina	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	fosfatidilcolina
(d) serina	$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-\text{NH}_3^+$	fosfatidilserina
(e) inositol		fosfatidilinositol

Fig. 5. Ejemplos de Fosfolípidos

Los esfingolípidos son moléculas anfipáticas, éstos también se conocen como fosfolípidos debido a la presencia del grupo fosfato (Fig. 6). Esta clase de lípidos se presentan en las membranas celulares del encéfalo y el tejido nervioso aunque pueden encontrarse en otras partes (Fig. 7).

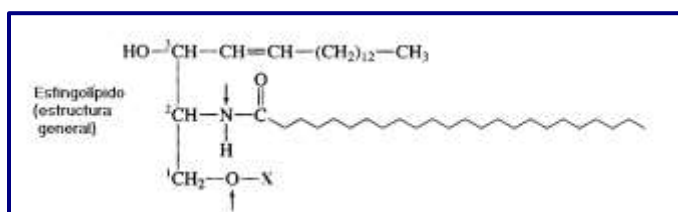


Fig. 6. Estructura general de un esfingolípido



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	135 /284

eluyente da un valor denominado R_f , el cual es característico para cada sustancia.

La separación de varios fosfolípidos empleando la cromatografía de capa fina se indica en la siguiente figura 8:

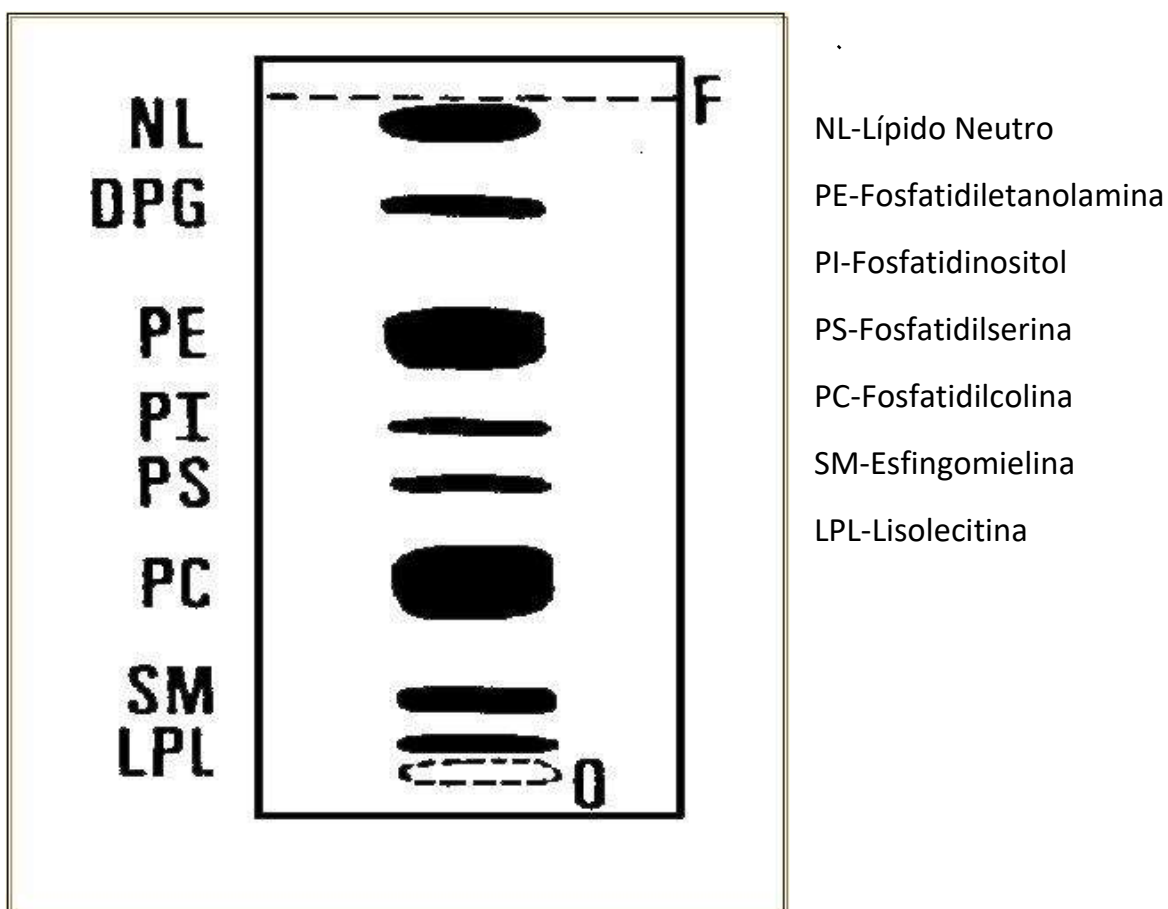


Figura 8. Cromatografía en capa fina de lípidos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	136 /284

Material y Equipo

- Vasos de precipitados de 250 y 500 mL
- Pipetas graduadas de 5 y 10 mL 1/100
- Probetas graduadas de 100 y 250 mL
- Cámara de cromatografía
- Cámara para revelado con Yodo metálico
- Tubos capilares o aplicadores
- Placas de vidrio 20X20 cm, grosor 0.5 cm.
- Aspersores
- Agitadores de vidrio
- Estufa

Reactivos

- Sílica gel
- Molibdato de sodio
- Sulfato de hidracina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ninhidrina
- Butanol
- Nitrato de bismuto
- Yoduro de potasio
- Ácido acético
- Hidróxido de sodio
- Yodo (cristales)
- Sistema de disolventes para la cromatografía: Cloroformo, metanol, ácido acético y agua destilada (65, 25, 8, 4)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	137 /284

Preparación de Disoluciones Reveladoras

1. Reactivo de molibdato (para fosfolípidos). Pesar 6.85 g de molibdato de sodio y 0.4 g de sulfato de hidracina y disolverlos en 100 mL de agua destilada. Añadir lentamente 100 mL de ácido sulfúrico concentrado, enfriar y aforar a 1000 mL con agua destilada.
2. Reactivo de ninhidrina (para amino-fosfolípidos). Pesar 0.5 g de ninhidrina y disolverlos en 100 mL de butanol.
3. Reactivo de bismuto (para fosfolípidos con colina).
 - a. Preparar dos soluciones:
 - i.Solución A: Pesar 1.7 g de nitrato de bismuto y disolverlos en 100 mL de ácido acético al 20% en agua destilada (V/V).
 - ii.Solución B: Pesar 40 g de yoduro de potasio (KI) y disolverlos en 100 mL de agua destilada.
 - b. Antes de utilizar el reactivo:
 - i.Mezclar 4 mL de la Solución A, 20 mL de ácido acético al 20% y 1 mL de la Solución B.

Método

1. Preparación del adsorbente.

- a. Pesar 2.5 g de silica gel G en un vaso de precipitado de 25 mL.
- b. Añadir lentamente y con agitación NaOH 0.01 N, hasta obtener una pasta uniforme libre de burbujas, de una consistencia que permita derramar el adsorbente, pero sin ser demasiado fluida (aproximadamente 6 mL).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	138 /284

2. Preparación y activación de placas.

- Lavar exhaustivamente con detergente las placas de vidrio, enjuagar con suficiente agua y secar con papel absorbente.
- Verter el adsorbente formando una capa uniforme en las placas.
- Dejar secar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Activar las placas en horno a 100-120°C durante una hora.
- Proteger las placas de vapores de laboratorio y del deterioro mecánico, debiendo presentar un aspecto uniforme sin granulaciones de gran tamaño.

3. Aplicación de la muestra.

Colocar a 1 cm de uno de los extremos tres aplicaciones equidistantes correspondientes a lípidos totales, lípidos fosforilados y lípidos no fosforilados en cuatro placas cromatográficas, dejando secar después de cada aplicación y cuidando de no perforar la capa de sílica.

4. Desarrollo del cromatograma.

Desarrollar la placa cromatográfica en una cámara de cromatografía saturada y sellada, utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo-metanol-ácido acético-agua (65:25:8:4, en volumen).

5. Revelado del cromatograma.

- Colocar una placa en una cámara que contenga cristales de yodo para revelar lípidos con insaturaciones, marcar cuidadosamente cada mancha con un lápiz.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	139 /284

- b. Rociar otra de las placas con reactivo de ninhidrina para revelar lípidos que contienen grupos amino primario y secundario (calentar la placa a 100°C durante 2 o 3 minutos en el horno).
- c. Rociar la tercera placa con el reactivo de bismuto para revelar lípidos que contienen colina.
- d. Rociar la cuarta placa cromatográfica con el reactivo de molibdato de sodio para fosfolípidos en general.

Resultados

- Hacer un esquema de las cromatoplasmas obtenidas con los diferentes reveladores.
- Comparar con los esquemas de cromatografía presentados en la literatura.
- Correlacionar los Rfs reportados y los prácticos.

Cuestionario

1. ¿Qué clases de lípidos se encuentran en la yema de huevo y cuál es su proporción?
2. ¿Cuáles son los métodos que se utilizan para el análisis de lípidos?
3. ¿Cuál es el fundamento de la cromatografía en capa fina?
4. ¿El reactivo de bismuto, ninhidrina y molibdato para que tipo de fosfolípidos son cada uno y que coloración se observa?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	140 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Cartwright IJ. Separation and Analysis of phospholipids by thin layer chromatography. En Methods in Molecular Biology, Vol 19: Biomembrane protocols: Isolation and Analysis. Humana Press INC. pp 153-167.
García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
3. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
5. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	141 /284

TITULACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Objetivos

- ✓ Determinar los pKa's de un aminoácido (aa) problema.
- ✓ Determinar de qué aminoácido se trata.
- ✓ Comprobar por medio de la reacción de Sörensen que los aminoácidos se comportan como iones dipolares.

Antecedentes académicos

- ✓ Propiedades de ácidos y bases.
- ✓ Curvas de titulación.
- ✓ Preparación de soluciones valoradas.
- ✓ Clasificación de los aminoácidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.

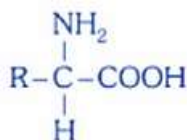


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	142 / 284

Introducción

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que conforman la unidad fundamental de las proteínas; poseen dos grupos funcionales característicos: un grupo amino -NH_2 y un grupo carboxílico -COOH .

En general, todos los aminoácidos obtenidos de la hidrólisis de una proteína son del tipo alfa, que corresponden a la siguiente fórmula general:



Donde R representa el esqueleto de carbono característico de cada aminoácido.

Un aminoácido simple (con grupo R polar), a pH neutro, es una molécula eléctricamente neutra. Esta neutralidad no se debe a que no tenga cargas sino a que su grupo carboxilo está cargado negativamente y el grupo amino positivamente, confiriendo al aminoácido una carga global nula.

Existen dos propiedades de los aminoácidos que indican que su comportamiento no es el que presenta un ácido carboxílico y una amina como compuestos orgánicos, una de ellas es la solubilidad que presentan (con algunas excepciones) en agua y la otra son los puntos de fusión altos, característicos de sustancias de tipo inorgánico.

Estas dos propiedades indican que los grupos de los aminoácidos se encuentran cargados, que son compuestos polares y además que en solución su estructura es de zwitterión o ion dipolar. Así por ejemplo la glicina presenta en solución la siguiente estructura: $^+\text{NH}_3\text{-CH}_2\text{-COO}^-$.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	143 /284

Lo que significa en este caso y de acuerdo con la definición de Brönsted, el grupo amino actúa como ácido ya que puede ceder un protón y el grupo carboxilo actúa como base ya que puede aceptar un protón.

Cada grupo amino o carboxilo de un aminoácido presentará un pKa (Tabla 1) que puede determinarse por la ecuación de Henderson-Hasselbach:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log [\text{A}^-] / [\text{HA}]$$

de donde si: $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$ tenemos que: $\log [\text{A}^-] / [\text{HA}] = \log 1 = 0$; entonces: $\text{pH} = \text{pKa}$

Lo que significa que el pKa de un ácido o una base es el pH en el cuál se encuentra titulado a la mitad (Fig. 1).

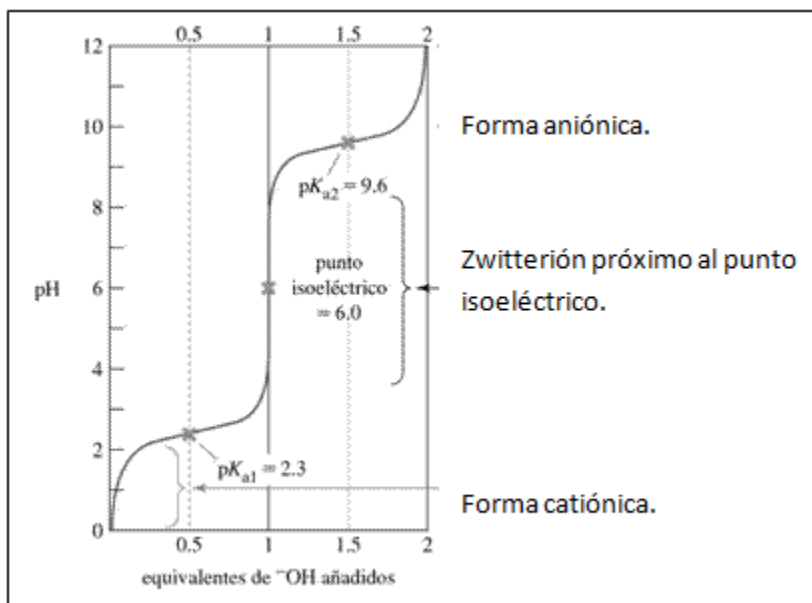


Fig. 1. Curva de titulación de glicina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	144 /284

Tabla 1. Valores de pK de los α aminoácidos más comunes			
alfa-aminoácido	pK ₁ alfa-COOH	pK ₂ alfa-NH ₃ ⁺	pK _R Cadena lateral
Alanina	2.35	9.87	
Arginina	1.82	8.99	12.48 (guanidino)
Asparagina	2.1	8.84	
Ácido aspártico	1.99	9.9	3.90 (beta-COOH)
Cisteína	1.92	10.78	8.33 (sulfhidrido)
Ácido glutámico	2.1	9.47	4.07 (gamma-COOH)
Glutamina	2.17	9.13	
Glicina	2.35	9.78	
Histidina	1.8	9.33	6.04 (imidazol)
Isoleucina	2.32	9.76	
Leucina	2.33	9.74	
Lisina	2.16	9.18	10.79 (epsilon-NH ₃ ⁺)
Metionina	2.13	9.28	
Fenilalanina	2.16	9.18	
Prolina	2.95	10.65	
Serina	2.19	9.21	
Treonina	2.09	9.1	
Triptófano	2.43	9.44	
Tirosina	2.2	9.11	10.13 (fenol)
Valina	2.29	9.74	



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	145 /284

Material y Equipo

- Gotero
- Bureta de vidrio con llave de teflón de 25 mL
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Soporte universal
- Pinza para bureta
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Potenciómetro

Reactivos

- Glicina 0.1N
- Hidróxido de sodio, (NaOH) 0.1 N valorado
- Ácido Clorhídrico, (HCl) solución concentrada
- Formol neutro
- Aminoácido básico 0.1 N
- Aminoácido ácido 0.1 N



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	146 /284

Método

1. Se repartirán a los alumnos las soluciones de los aminoácidos: glicina, el aminoácido básico y el ácido; etiquetados arbitrariamente como aa1, aa2 y aa3; de manera que cada equipo trabaje con un aminoácido sin saber de cuál se trata.

2. Llevar la muestra de aminoácido a pH 1.5 mediante la adición de HCl concentrado (Fig. 2).



Fig. 2. Adición de HCl.

3. Titular la muestra de 20 mL de aminoácido con una solución valorada de NaOH 0.1 N hasta llegar a pH 13, tomando lecturas de pH después de cada adición de 1 o 2 mL (Fig. 3).



Fig. 3. Titulación de la solución de aminoácido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	147 / 284

4. Repetir la titulación con otros 20 mL de aminoácido (previamente llevado a pH 1.5 con HCl) adicionando a cada muestra 10 mL de formol neutro. Registrar el pH de la misma forma que en la primera titulación.

Resultados

- Con los datos obtenidos durante las titulaciones, graficar:
 - pH contra meq (miliequivalentes) gastados de NaOH.
 - pH contra meq gastados de NaOH en la titulación del aa en presencia de formol.
- Determinar los pKa's de su aa problema.
- Señalar las diferencias observadas en las curvas de titulación del aa en presencia de formol.
- Realizar todo lo anterior con las otras muestras de aminoácidos trabajadas por los otros equipos.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los aminoácidos básicos? Escriba su estructura a pH ácido.
2. ¿Cuáles son los aminoácidos ácidos? Escriba su estructura a pH ácido.
3. ¿Qué es el pKa? ¿Cómo se obtiene?
4. En la gráfica de titulación de un aminoácido, con NaOH y HCl señale dónde se localiza el pKa de cada grupo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	148 /284

5. ¿Cómo determina el punto isoeléctrico de un aminoácido neutro, de uno ácido y de uno básico?
6. ¿Cómo se aplicaría la ecuación de Henderson-Hasselbach para preparar una solución amortiguadora de pH 4?
7. ¿Cómo esperaría los resultados de la titulación de un aminoácido en presencia de formol? ¿Por qué?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Blanco D., Garrido A., Teijón J. et al. Fundamentos de Bioquímica estructural. México: Alfaomega; 2005.
3. Fornaguera J, Gómez G. Bioquímica: la ciencia de la vida. Costa Rica: EUNED; 2004.
4. Giraldo G, Loango N, Mejía C. Laboratorio de Bioquímica: una visión práctica. Colombia: Universidad de Quindío; 2010.
5. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 28a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
6. Quesada S. Manual de experimentos de laboratorio para Bioquímica. Costa Rica: EUNED; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	149 /284

CROMATOGRAFÍA DE AMINOÁCIDOS

Objetivos

- ✓ Aplicar la técnica de cromatografía para la separación de una mezcla de aminoácidos.
- ✓ Explicar los fundamentos de la separación en la cromatografía en capa fina.
- ✓ Analizar los factores que modifican la resolución de ésta técnica.

Antecedentes académicos

- ✓ Fundamentos de la cromatografía.
- ✓ Estructura química de los aminoácidos.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos.
- ✓ Clasificación de los aminoácidos.
- ✓ Pruebas para la identificación de aminoácidos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	150 /284

Introducción

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que conforman la unidad fundamental de las proteínas; poseen dos grupos funcionales característicos: un grupo amino -NH_2 y un grupo carboxílico -COOH .

En general, todos los aminoácidos de un hidrolizado de proteína son del tipo alfa, que corresponden a la siguiente fórmula general (Fig. 1):

Un carbono con un grupo amino (-NH_2), un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo lateral R (Figura 1).

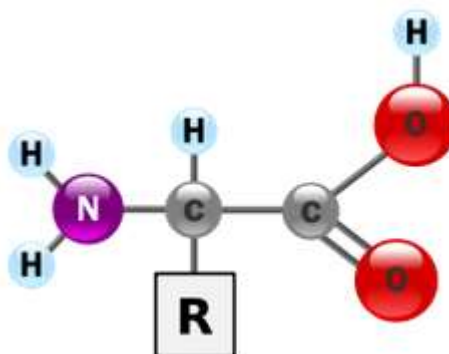


Fig. 1. Estructura general de los aminoácidos.

El grupo R representa el esqueleto carbonado característico del aminoácido en cuestión y que es el que le distingue de los demás.

Los aminoácidos pueden ser clasificados de acuerdo a su carácter ácido o básico. Así podrían ser:

- a) Neutros: alifáticos, aromáticos, azufrados, secundarios.
- b) Ácidos.
- c) Básicos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	151 /284

Tabla 1. Clasificación de aminoácidos de acuerdo a su polaridad			
Aminoácido	Tipo	Ejemplo	Estructura
	Con grupo R no polares	Alanina (ALA)	<chem>CC(N)C(=O)O</chem>
		Valina (VAL)	<chem>CC(C)C(N)C(=O)O</chem>
		Leucina (LEU)	<chem>CC(C)C(C)C(N)C(=O)O</chem>
		Isoleucina (ILE)	<chem>CC[C@H](C)[C@H](N)C(=O)O</chem>
		Metionina (MET)	<chem>CSCC[C@H](N)C(=O)O</chem>
	Con grupo R polares sin carga	Glicina (GLY)	<chem>NCC(=O)O</chem>
		Serina (SER)	<chem>OC[C@H](N)C(=O)O</chem>
		Treonina (THR)	<chem>CC(O)[C@H](N)C(=O)O</chem>
		Tirosina (TYR)	<chem>OC1=CC=C(C=C1)CC[C@H](N)C(=O)O</chem>
		Glutamina (GLN)	<chem>NC(=O)CC[C@H](N)C(=O)O</chem>
	Con grupo R cargados negativamente	Ácido aspártico (ASP)	<chem>OC(=O)CC[C@H](N)C(=O)O</chem>
		Ácido glutámico (GLU)	<chem>OC(=O)CCC[C@H](N)C(=O)O</chem>
	Con grupo R cargados positivamente	Lisina (LYS)	<chem>NC(CCC[NH2+])C(=O)O</chem>
		Arginina (ARG)	<chem>NC(=[NH2+])NCCC[NH2+]C(=O)O</chem>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	152 /284

No obstante; tiene más interés y significación para su análisis conformacional, el método de clasificación basado en la polaridad de sus grupos R, cuando se hallan en disolución acuosa en un pH próximo a 7.0 (Tabla 1).

Precisamente por sus características de polaridad, los aminoácidos o mezclas de ellos son susceptibles a análisis cromatográficos. Entre los métodos de cromatografía en un plano están la cromatografía en capa fina (CCF) y la cromatografía en papel (CP). En ambos casos se emplea una capa plana y relativamente delgada de un material que a la vez es la fase de soporte, o bien, cubre una superficie de vidrio, plástico o metal. La fase móvil se desplaza por la fase estacionaria por acción capilar, a veces ayudada por la gravedad o por la aplicación de un potencial eléctrico.

Por medio de la cromatografía pueden separarse una mezcla de aminoácidos sobre un medio de sostén, los distintos aminoácidos presentes en la mezcla son arrastrados a distintas velocidades sobre un soporte que puede ser papel, sílica gel o una columna con resina adsorbente o de intercambio iónico.

Cuando se utiliza la cromatografía en placa fina, la relación entre la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación sobre la distancia que recorre el eluyente da un valor denominado R_f (razón de frentes), que es característico para cada sustancia y en nuestro caso para cada aminoácido (Figura 2.)

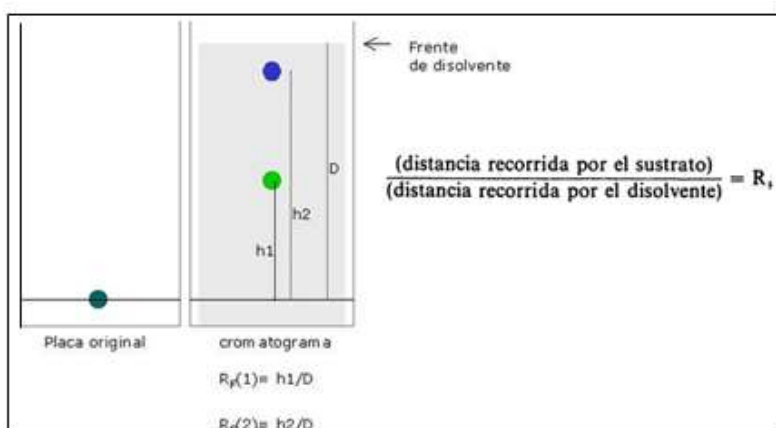


Figura. 2.
Representación del
cálculo de R_f



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	153 /284

Debido a que en general, los aminoácidos son solubles en agua y mucho menos solubles en disolventes orgánicos, los valores de R_f (Tabla 2) se incrementan con el contenido de agua en el eluyente y disminuyen con el aumento de peso molecular y el punto de ebullición del eluyente.

Valores R_f de algunos aminoácidos	
Alanina	0.38
Arginina	0.28
Ácido aspártico	0.24
Ácido glutámico	0.3
Glicina	0.26
Histidina	0.48
Isoleucina	0.85
Leucina	0.73
Lisina	0.14
Metionina	0.4
Fenilalanina	0.71
Serina	0.27
Treonina	0.35
Tirosina	0.47
Valina	0.6

Tabla 2. Valores de R_f de aminoácidos, usando como eluyente butanol-ácido acético-agua en proporción 12:3:5.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	154 /284

Material y Equipo

- Placa de vidrio de 20x20 cm
- Estufa
- Papel filtro de poro abierto
- Cámara de elución
- Capilares sin heparina
- Aspersores
- Guantes desechables
- Vaso de precipitado de un litro
- Agitador de vidrio

Reactivos

- Mezcla eluyente. Butanol: Ácido Acético: Agua (4:1:1)
- Soluciones de aminoácidos a una concentración de 1 mg/10 mL
- Mezcla problema de algunos aminoácidos de las soluciones anteriores.
- Solución de ninhidrina al 0.2% (0.2 g/100 mL) en acetona o butanol)
- Sílica gel
- Hidróxido de sodio 10 mM



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	155 /284

Método

1. Previamente preparar la placa cromatográfica sobre un vidrio de 20 x 20 cm, colocando una solución espesa de sílica gel en hidróxido de sodio 10 mM y dejar secar (Fig. 3).
2. Activar con anticipación las placas cromatográficas dentro de una estufa a 90°C por 1 hora (Fig.4).



Fig. 3. Placa cromatográfica.

Fig. 4. Estufa para la activación de placas.

2. Con un día de anticipación llenar la cámara de elución con aproximadamente 200 mL de la mezcla eluyente e introducir un cuadro de papel filtro de 20 x 20 cm, con el objetivo de que al usarla se encuentre saturada (Figs.5 y 6).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	156 /284



Fig. 5. Llenado de cámara de elución

Fig. 6. Saturación de la cámara

3. Colocar la placa activada sobre una hoja cuadriculada de manera que sirva de referencia para aplicar las muestras 2 cm por encima del borde inferior de la placa (Fig. 7) con la ayuda de un capilar estirado con calor. Las muestras deben tener 2 cm de separación entre sí; después de cada aplicación se deberá esperar a que el estándar o mezcla de aminoácidos seque perfectamente para volver a aplicar. Con la finalidad de ahorrar tiempo para permitir la elución al menos 4 horas, la aplicación de aminoácidos también puede hacerse con anticipación.



Fig. 7. Aplicación de estándares y mezclas de aminoácidos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	157 /284

5. Una vez aplicados los estándares y la mezcla de aminoácidos, colocar la placa dentro de la cámara cromatográfica que a partir de este momento se encontrará fija y nivelada (Fig. 8).



Fig. 8. Introducción de la placa dentro de la cámara de elución

5. Dejar correr la elución y sacar las placas de la cámara cuando el eluyente esté aproximadamente 2 cm antes del borde (Fig. 9). Inmediatamente después de sacar las placas, marcar con un lápiz el frente del eluyente (Fig. 10).



Fig. 9. Elución.



Fig. 10. Frente del eluyente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	158 /284

6. Dejar secar las placas en la campana de extracción y después con ayuda de un aspersor aplicar la solución de ninhidrina. Colocar en estufa a 110°C por 10 minutos para revelar la presencia de aminoácidos (Fig. 11).

Precaución: La ninhidrina debe manipularse con guantes debido a su toxicidad.



Fig.11. Manejo de Ninhidrina.

Resultados

- Tomar una fotografía de la placa revelada.
- Calcular los R_f de cada uno de los estándares de aminoácidos y determinar qué aminoácidos contenía la mezcla problema.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las aplicaciones de la cromatografía?
2. Indique cómo realizaría una cromatografía bidimensional.
3. ¿Cuál es la reacción de los aminoácidos con la ninhidrina?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	159 /284

4. ¿Qué otros reactivos pueden utilizarse para desarrollar color en una cromatografía de aminoácidos?
5. ¿Qué ventajas presenta la ninhidrina en comparación de los otros reactivos que desarrollan el color?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2008.
2. Blanco D, Garrido A, Teijón J, et al. Fundamentos de bioquímica estructural. México: Alfaomega; 2005.
3. Crouch D, Holler F, Skoog D. Principios de análisis instrumental. México: Cengage Learning. 6° ed.; 2008.
4. Aguilar L., Escalante R. Manual de prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2008.
5. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper: Bioquímica ilustrada. 28a ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2010.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	160 /284

SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Objetivos

- ✓ Separar albúmina y globulina a partir de una muestra de sangre.
- ✓ Determinar cuantitativamente por medio de una curva estándar la concentración de proteínas totales, albúmina y globulinas presentes en el plasma por el método de Biuret.

Antecedentes académicos

- ✓ Método de obtención de muestra sanguínea.
- ✓ Diferencias entre suero y plasma sanguíneo.
- ✓ Características generales de anticoagulantes.
- ✓ Clasificación de las proteínas plasmáticas
- ✓ Funciones de las proteínas plasmáticas
- ✓ Concentración plasmática de las principales proteínas
- ✓ Principales técnicas de separación y cuantificación de proteínas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	161 /284

Introducción

La sangre es el fluido corporal más utilizado con fines analíticos. Los tres procedimientos habituales para obtener sangre son: punción cutánea, punción venosa y punción arterial.

La composición de la sangre venosa varía según la actividad metabólica del organismo o tejido perfundido por lo que el punto en el que se extrae la muestra puede influir en la composición de la sangre venosa. La sangre venosa tiene menos oxígeno que la arterial, pero también se diferencia de ésta por el pH, su concentración de dióxido de carbono y su hematocrito. A veces también varían las concentraciones de glucosa, ácido láctico, cloro y amonio.

Las proteínas plasmáticas constituyen un grupo de aproximadamente cincuenta proteínas contenidas en el fluido sanguíneo, para diferenciarlas de las que pueden aparecer de forma transitoria deben cumplir los siguientes requisitos:

- a) Ser secretadas activamente a la sangre
- b) No derivar de lesiones ni alteraciones de tejidos o células
- c) Ejercer su función fundamental en el sistema vascular
- d) Presentar mayor concentración en el plasma que en cualquier otro tejido.

La concentración presente de cada una de las proteínas plasmáticas es muy variable oscilando desde los 0.01 g/100 mL hasta los 5 g/100 mL, siendo el contenido total de proteínas en el plasma de 6–8 g/100 mL. Las proteínas plasmáticas por su importancia se clasifican en tres grupos principales: albúmina, globulinas y fibrinógeno.

Para la obtención y separación de las proteínas plasmáticas se hace uso de varias técnicas basadas en sus propiedades características, como son:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	162 /284

tamaño, solubilidad, forma molecular, especificidad inmunológica y carga eléctrica, entre otras.

De acuerdo a su patrón de agrupamiento en la migración electroforética, las proteínas plasmáticas pueden agruparse en:

- albúmina (constituye el 55% del total de las proteínas plasmáticas con una cantidad aproximada de 4 g/100 mL).
- α_1 -globulinas: α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -antitripsina, α_1 -fetoglobulina, α_1 -antiquimiotripsina, transcortina, inhibidor inter- α_1 - de la tripsina, proteína transportadora de retinol, α_1 -lipoproteínas, α_1 -B y α_1 -T glicoproteínas (5% del total, de 0.3-0.6 g/100 mL).
- α_2 -globulinas: haptoglobina, α_2 -macroglobulina, ceruloplasmina, hemopexina y transferrina (9% del total, de 0.4-0.9 g/100 mL).
- β -globulinas: β -globulina ligadora de esteroides, β_2 -microglobulina, fibrinógeno, β_1 -glicoproteína específica del embarazo, β -lipoproteínas y proteína C reactiva (13% del total, de 0.6-1.1 g/100 mL).
- γ -globulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE (11% del total, de 0.7-1.5 g/100 mL).

La albúmina se sintetiza en forma de proalbúmina en el retículo endoplasmático del hígado. Transporta tanto sustancias aniónicas como catiónicas, entre las que cabe destacar la bilirrubina, fármacos como el ácido acetilsalicílico, aminoácidos como el triptófano y algunas hormonas esteroides y tiroideas. Su otra gran función es la del mantenimiento del volumen vascular, a ella se debe el 80% de la presión osmótica del plasma al existir unas 17 cargas negativas en su estructura a pH fisiológico¹. Las globulinas en conjunto representan aproximadamente el 38% del total de las proteínas plasmáticas y entre sus funciones destacan el transporte de lípidos y la secreción de anticuerpos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	163 /284

En la presente práctica obtendremos de forma directa la concentración de proteínas totales y albúmina mediante el método de Biuret, el cual se basa en la formación de un compuesto de color violeta provocado por la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos en medio alcalino presentando un máximo de absorción a 540 nm. Para obtener la albúmina eliminaremos las globulinas con la técnica de precipitación por salado (salting out), la diferencia del contenido de proteínas totales y albúmina será la cantidad aproximada de globulinas que fueron eliminadas.

Material y Equipo

- Probeta graduada de 10 mL.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Gradilla.
- Termómetro.
- Tubo Vacutainer® con anticoagulante (EDTA).
- Aguja para Vacutainer®.
- Papel parafilm.
- Tubos de ensayo de 13 X 100.
- Marcador indeleble de punta extrafina.
- Micropipetas p20. p200, p1000 y p5000, microlitros.
- Pipetas de 0.2, 1 y 5 mL
- Puntas nuevas para las micropipetas.
- Pipetas Pasteur.
- Centrífuga.
- Balanza analítica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	164 /284

- Espectrofotómetro.
- Parrilla de calentamiento o estufa.
- Baño María a 35°C.

Reactivos

- Solución de sulfato de sodio al 23% P/V en agua.
- Eter etílico.
- NaOH 0.1N
- Solución estándar de albúmina 350 mg/100 mL de NaOH 0.1N.
- NaOH 1 N.
- Reactivo de Biuret.
 - Pesar 4.5 g de tartrato doble de sodio y potasio, 2.5 g de yoduro de potasio y 1.5 g de sulfato de cobre pentahidratado. Disolver por separado en vasos con aproximadamente 50 mL de agua destilada. De ser necesario calentar para disolver. Una vez disueltos los tres reactivos dejar enfriar. Colocar en un matraz aforado de 500 mL, 100 mL de NaOH 1N, después agregar en orden cada una de las soluciones (el cobre al final) mezclar cuidadosamente después de cada adición y aforar con agua destilada. Se conserva en un frasco ámbar.

Método

1. Obtener una muestra sanguínea (3-5 mL) por venopunción con un sistema Vacutainer® usando como anticoagulante (EDTA).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	165 /284

- a. Preparar el material: tubos, ligadura, torundas, jeringas (cuando sea necesario) aguja estéril y dispositivo Vacutainer® para fijarla
- b. Identificar el tubo
- c. Colocar adecuadamente al donador
- d. Solicitar al paciente que cierre al puño para que las venas resulten más palpables
- e. Seleccionar la vena adecuada para la punción
- f. Limpiar la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol isopropílico al 70%, o yodopovidona al 1%. Se comienza en el punto de la punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento en espiral
- g. Aplicar si es necesario un torniquete varios centímetros por encima de la zona de punción. No dejarlo más de un minuto.
- h. Fijar la vena tanto por encima como por debajo del lugar de punción, con ayuda de los dedos pulgar y medio o índice y pulgar.
- i. Realizar la venopunción penetrando la piel con la aguja formando un ángulo de 15° con el brazo y con el bisel hacia arriba se sigue la dirección de la vena; introducir la aguja con suavidad pero con rapidez para reducir las molestias. No hay que “enterrar” la aguja. Si se utiliza una jeringa, se tira hacia atrás del émbolo, con tensión lenta y uniforme a medida que la sangre va fluyendo en su interior. Si se utiliza un tubo al vacío, en cuanto la aguja haya penetrado en la vena se dirigirá el tubo todo lo posible hacia delante apoyándose en el dispositivo de sujeción (de la misma forma en que se introduce el émbolo de una jeringa). Al mismo tiempo mantenga firmemente la aguja en su lugar. Una vez que se haya llenado el tubo, se retira tomándolo por su extremo y tirando suavemente de él. Se mezcla la sangre con el anticoagulante por inversión suave del tubo de 8 a 10



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	166 /284

veces. Si la muestra ha sido extraída con jeringa se transferirá a los tubos correspondientes después de retirar la aguja.

- j. Cuando la sangre comience a fluir se libera el torniquete. Una vez obtenida la muestra, hay que indicar al paciente que relaje el puño y que no “bombee” con la mano.
- k. Coloque suavemente una torunda de algodón sobre el punto de punción. Se extrae la aguja (con un movimiento rápido) y a continuación se ejerce presión sobre la zona. NO aplique masaje.²

2. Centrifugar el tubo a 3000 rpm durante 5 minutos y separar con cuidado el plasma.
3. Colocar 0.25 mL de plasma en un vaso, adicionar 4.75 mL de sulfato de sodio al 23% P/V. Tapar y mezclar por inversión tres veces. Tomar 1 mL de la suspensión y colocarlo en un tubo, etiquetar como proteínas totales. Agregar 1.5 mL de éter etílico al resto de la suspensión, tapar y mezclar por inversión (sin agitar), centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
4. Después de centrifugar, tomar 1 mL de la capa inferior y colocarlo en un tubo, etiquetar como albúminas.
5. Preparar 7 tubos y numerarlos del 1 al 6 y a otro nombrarlo blanco. Agregar a cada uno lo indicado en el cuadro 1.
6. Leer en el espectrofotómetro a 540 nm y registrar los valores.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	167 /284

**Cuadro 1. SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS**

Tubo con mL de:	Blanco	1	2	3	4	5	6	7
Solución patrón de proteínas				0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Agua destilada	1			0.8	0.6	0.4	0.2	
Solución de proteínas totales (problema)		1						
Solución de albúminas (problema)			1					
Reactivo de Biuret	2	2	2	2	2	2	2	2
Coloque los tubos en baño maría a 30-35° C, durante 10 minutos								
Dejar reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos.								
Determine la absorbancia de cada uno de los tubos contra el blanco a 540 nm								
Resultados de absorbancia								



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	168 /284

Resultados

- Grafique la curva estándar con los resultados de absorbancia de los tubos 3 al 7, contra la concentración de albúmina en masa contenida en los mismos.
- Interpole las absorbancias de los tubos de proteínas totales y albúmina para obtener su concentración en masa dentro de cada tubo.
- Determine la concentración de proteínas totales y albúmina contenida en 100 mL de plasma tomando en cuenta las diluciones de la muestra.
- Calcule la concentración de globulinas que fueron eliminadas de las proteínas totales.

Cuestionario

1. Mencione las funciones de las principales proteínas plasmáticas.
2. Si utilizara el método de Lowry para detectar las proteínas plasmáticas ¿diluiría más la muestra? Si o no y por qué.
3. Escriba la reacción del cobre contenido en el reactivo de Biuret con el nitrógeno de los enlaces peptídicos en un medio alcalino.
4. ¿Qué propiedades de las globulinas se utilizan para separarlas de las proteínas totales?
5. Mencione dos técnicas diferentes a las usadas para determinar proteínas y explique sus fundamentos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	169 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, García-del Valle A, Corona-Ortega MT, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología del laboratorio de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). Material en CD e impreso. México: FES Zaragoza; 2008.
2. Devlin TM. Bioquímica Tomo I y II. 4ta ed. España:Ed. Reverté; 2004.
3. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2010.
4. Henry J. B. (Tood-Sanford-Davidsohn). Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. Tomo 1. 8ª ed. España: Salvat; 1988.
5. Morán L. Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica. 1ª ed. México: Panamericana; 2001.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	170 /284

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Objetivos

- ✓ Separar las proteínas del plasma o suero sanguíneo, mediante la técnica de electroforesis vertical en poliacrilamida (PAGE-SDS).
- ✓ Manejar adecuadamente los reactivos y equipos para realizar la electroforesis.
- ✓ Analizar las bandas obtenidas en el gel de poliacrilamida, identificando a qué tipo de proteína corresponde.
- ✓ Considerar la importancia que tiene la electroforesis de proteínas y sus aplicaciones clínicas y de investigación.

Antecedentes académicos

- ✓ Estructura de las Proteínas
- ✓ Métodos de purificación de proteínas
- ✓ Carga eléctrica de las proteínas
- ✓ Fundamento de la técnica de electroforesis
- ✓ Componentes proteicos del plasma y suero de la sangre



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	171 /284



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	172 /284

Introducción

Las proteínas son compuestos nitrogenados que por hidrólisis dan lugar a los aminoácidos. Las proteínas son componentes fundamentales de todas las células (función estructural), controlan el desdoblamiento de los alimentos para dar energía y la síntesis de nuevos compuestos para la conservación y reparación de los tejidos (función enzimática y hormonal), representan prácticamente la única forma en que el individuo restituye el nitrógeno que pierde. Por ello, no sólo el hombre, sino todos los animales deben tener una fuente adecuada de proteínas en su dieta, para crecer y conservarse de manera autónoma.

En otro orden de ideas, la electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-energía. Es un método que permite separar las proteínas en función de su carga neta al someterla a un campo eléctrico. En la electroforesis, la fuerza que mueve la macromolécula es el potencial eléctrico (E). La movilidad electroforética de la molécula (μ) viene dada por la razón de la velocidad de la partícula (V) al potencial eléctrico; y también es igual a la carga neta de la molécula (Ze), dividida por el coeficiente de fricción (f):

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Ze}{f}$$

El coeficiente de fricción (f) depende del tamaño y la forma de la molécula, por lo tanto, la ecuación anterior nos indica que la movilidad de una molécula depende de su carga y de las dimensiones moleculares. La electroforesis no suele utilizarse para purificar proteínas, ya que hay que teñirlas para



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	173 /284

visualizarlas y en este proceso generalmente se inactivan. Sin embargo, es muy útil como método analítico, ya que al poder visualizarse por tinción puede hacerse una primera estimación del contenido de proteínas de una mezcla, o de la pureza de una preparación. Además, mediante esta técnica puede determinarse tanto el punto isoeléctrico de una proteína como su masa molecular aproximada.

La electroforesis de proteínas, o macromoléculas en general, se lleva a cabo utilizando algún medio de soporte, siendo los más habituales el acetato de celulosa o geles de poliacrilamida entrecruzados, todos estos soportes están humedecidos o contienen la solución tampón que controla el pH del medio, y están dispuestos en una cubeta que tiene dos electrodos. Sobre el soporte se colocan las muestras de proteínas que se desea separar, y se aplica la corriente eléctrica.

Posteriormente las proteínas se visualizan mediante tinción con un colorante. Las bandas se identifican comparándolas con una serie de patrones que han corrido al mismo tiempo en el mismo soporte. La concentración de proteína de cada banda puede determinarse mediante la lectura del soporte en un densitómetro.

Para lograr lo anterior, la mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper todas las interacciones no covalentes dentro de la proteínas, se añade mercaptoetanol o ditiotreitól para producir los puentes disulfuro y un buffer de carga o Laemli que es una mezcla de colorante azul de bromofenol (el cual permitirá saber dónde se encuentra la muestra) glicerol (que es más denso que el agua y hará que la muestra no difunda en el buffer de electroforesis) y TRIS (como regulador de pH). Una vez que la mezcla de proteínas ha sido adicionada con todos estos compuestos, se hierve por 5 minutos, con la finalidad de desnaturalizar y romper enlaces disulfuro en las proteínas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	174 /284

Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da el complejo SDS-proteína desnaturalizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Al ser la carga negativa, adquirida por fijación de SDS, muy superior a la carga propia de la proteína, esta carga se considera despreciable. Los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis sobre gel de poliacrilamida, que normalmente se utiliza como un bloque delgado dispuesto verticalmente. La dirección de la electroforesis es vertical descendente. Por último, al finalizar la separación de las proteínas, éstas pueden visualizarse sobre el gel tiñéndolas con plata o azul de Comassie, que revela una serie de bandas. Si hubiera marcaje radiactivo podría detectarse colocando una placa de rayos X sobre el gel y revelándola, procedimiento que se conoce como autorradiografía.

Como ejercicio en esta práctica separaremos proteínas plasmáticas totales y/o suero; además para comparar las fracciones de globulinas y albúmina separadas en la sesión de separación de proteínas plasmáticas.

Mediante una separación electroforética de las proteínas del plasma se obtienen varias fracciones: albúmina (60%), α -globulina 1 (4%), α -globulina 2 (8%), β -globulinas (12%), fibrinógeno (4%) y γ -globulinas (16%). Esta clasificación se refiere principalmente al comportamiento electroforético.

Material y Equipo

- Micropipetas p20 p200 y p1000 μ L
- Puntas nuevas para micropipetas
- Guantes
- Cubre bocas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	175 /284

- Tubos eppendorf
- Balanza analítica
- Cámara de electroforesis vertical
- Fuente de poder
- Parrilla de calentamiento
- Regla, plumón negro
- Papel filtro
- Vaso de precipitado
- Recipiente rectangular de plástico con tapa
- Agitador orbital

Reactivos

- Suero o plasma sanguíneo diluido 1:1000. Tomar 1 μ L de la muestra y colocarlo en 1 mL de NaOH 0.1N.
- Dilución de albúmina 1:40 (obtenida en la práctica de separación de proteínas plasmáticas). Tomar 5 μ L de la muestra y colocarlos en 200 μ L de NaOH 0.1N.
- Dilución de globulinas precipitadas 1:20 (obtenidas en la práctica de separación de proteínas plasmáticas). Tomar 10 μ L de la muestra y colocarlos en 200 μ L de NaOH 0.1N.
- Agarosa al 2%. Pesar 0.2 g de agarosa y adicionar 10 mL de agua destilada.
- TRIS 1.5 M (pH 8.8). Amortiguador del gel separador (inferior): Pesar 18.2 g de TRIS; disolver en $\sim$ 75 mL de agua, ajustar a pH 8.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.
- TRIS 1 M (pH 6.8). Amortiguador del gel compactador (superior): Pesar 12.1 g TRIS; disolver en $\sim$ 75 mL de agua, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	176 /284

- SDS al 10%. Pesar 1 gramo de SDS y adicionar 10 mL de agua destilada, disolver lentamente, mantener en refrigeración.
- Amortiguador del gel compactador (superior): Pesar 12.1 g TRIS; disolver en ~75 mL de agua, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.
- Persulfato de amonio 10%. Pesar 1g de persulfato de amonio y adicionar 10 mL de agua destilada, hacer alícuotas de 1 mL y guardar en el congelador.
- Tetrametiletileno-diamina (TEMED)
- Mercaptoetanol
- Mezcla acrilamida-bis acrilamida (30%). Mezcla acrilamida-bis acrilamida (30%): Pesar 0.8 g de bis-acrilamida y 30 g de acrilamida. Disolver la bis-acrilamida en 100 mL de agua destilada, una vez disuelta, se adicionan los 30 g de acrilamida y se calienta el matraz hasta que se haya disuelto la acrilamida. **Nota: Ambas sustancias son altamente tóxicas, usar guantes y cubrebocas para su manipulación.**
- Buffer de electroforesis (5X) para preparar 500 mL buffer 1X. Pesar 2.5 g de SDS, 72 g de glicina y 15.15 g de TRIS. Disolver primero SDS en 800 mL de agua, a continuación, adicionar la glicina y el Tris. Ajustar el pH a 8.3 con HCl y aforar a 1000 mL.
- Solución azul de Comassie. Pesar 0.05 g de azul de comassie y disolverlo en una solución de metanol-ácido acético-agua 50:7:43.
- Buffer de Laemli (2X). Usar 3.125 mL de TRIS 1M pH 6.8, 1 g de SDS, 0.005 g de azul de bromofenol y 5 mL de glicerol y 0.2 mL de mercaptoetanol. Completar a 10 mL con agua destilada. **Nota: Contiene mercaptoetanol, se prepara en la campana de extracción.**
- Solución desteñidora. Mezclar 200 mL de metanol, 70 mL de ácido acético y 730 mL de agua.
- Hidróxido de sodio 0.1N
- Marcador de peso molecular de proteínas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	177 /284

Método

1. Armado de la cámara de electroforesis para formar el gel.
 - a. Localizar las partes que contiene la cámara como se muestra en la Fig. 1).
 - b. Utilizando guantes, limpiar los dos vidrios (vidrio de desplazamiento y vidrio con muescas) con un poco de agua destilada.
 - c. Ajustar los separadores del gel en cada una de las orillas de los vidrios (Fig. 2) colocando el vidrio con muescas detrás del vidrio de desplazamiento (Fig. 3).
 - d. Colocarlos en la “cámara de amortiguador superior” para la preparación del gel de poliacrilamida (Fig. 4) y ajustarlos al tope de la cámara (Fig. 5).
 - e. Girar despacio el botón de ajuste para que queden fijos los vidrios y la mezcla del gel no se salga. (Fig. 6). **Nota: Vigilar que queden bien juntos y evitar ejercer demasiada fuerza para no romper los vidrios.**
 - f. Sellar la parte inferior de la cámara con 10 mL de agarosa al 2% y esperar a que la agarosa solidifique (Fig. 7). **Nota: Este sello impide que la mezcla del gel de poliacrilamida se derrame.**



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	178 /284

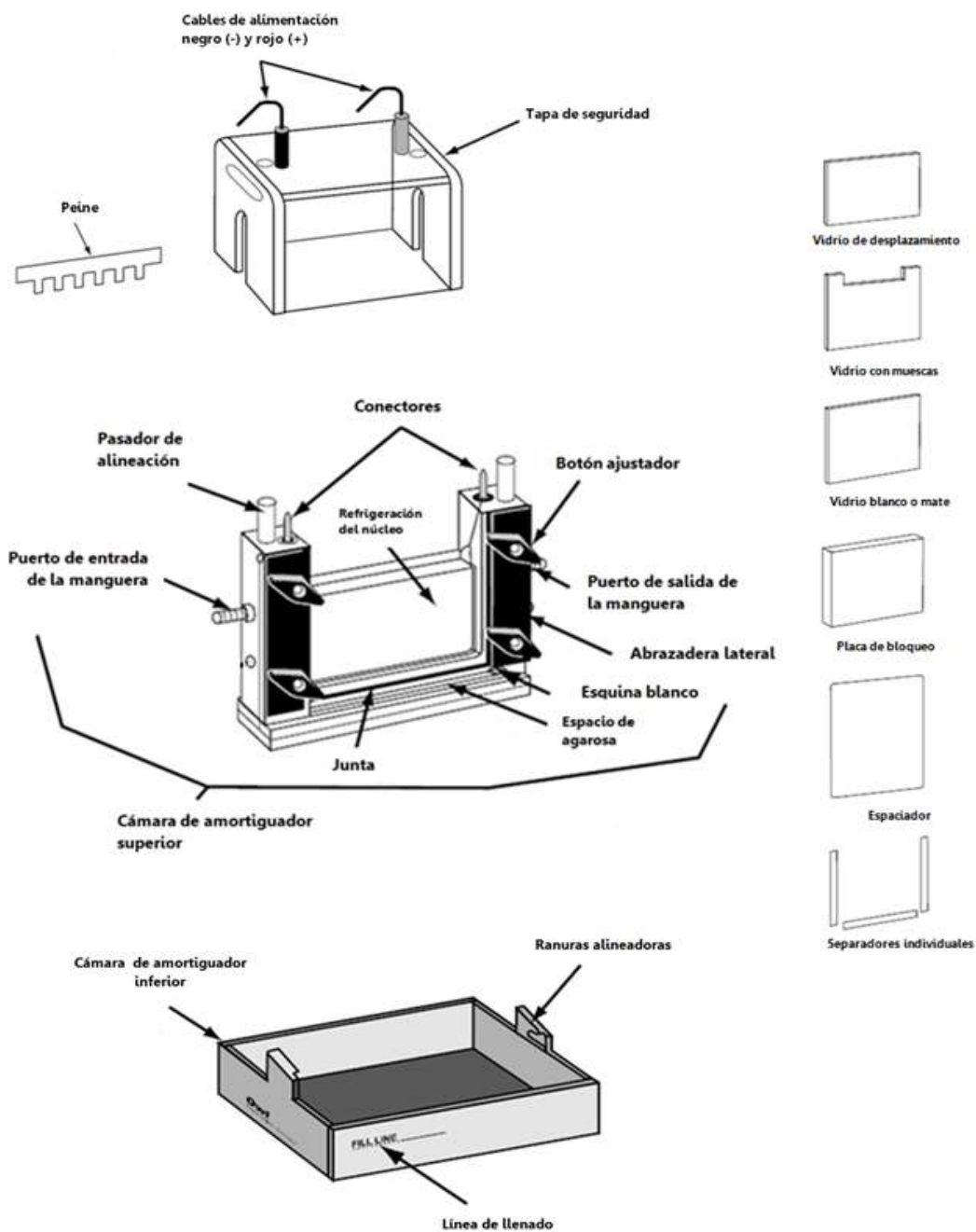


Fig. 1. Cámara de electroforesis vertical



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	179 /284

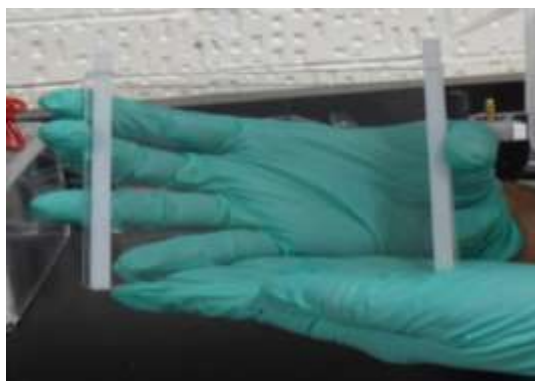
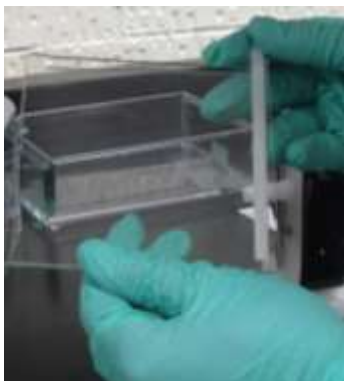


Fig. 3. Vidrios con los separadores colocados (se observa el vidrio con muescas en la parte posterior)

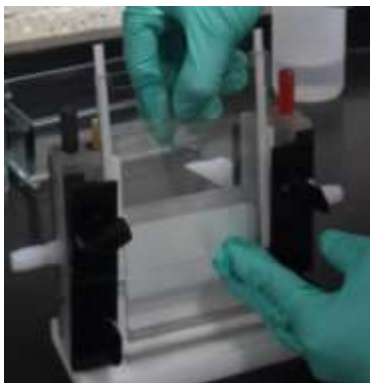


Fig. 4. Montado de los vidrios en la "cámara de amortiguador superior"

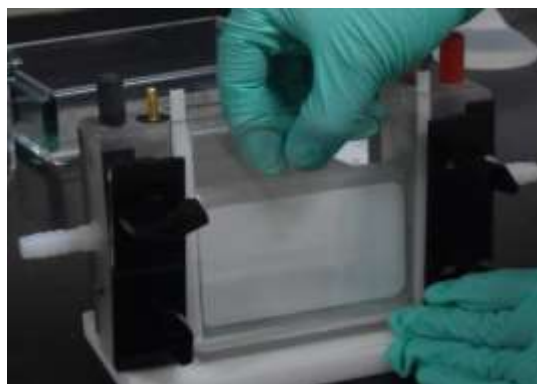


Fig. 5. Ajuste de los vidrios en la cámara



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	180 /284



Fig. 6. Ajuste de los vidrios

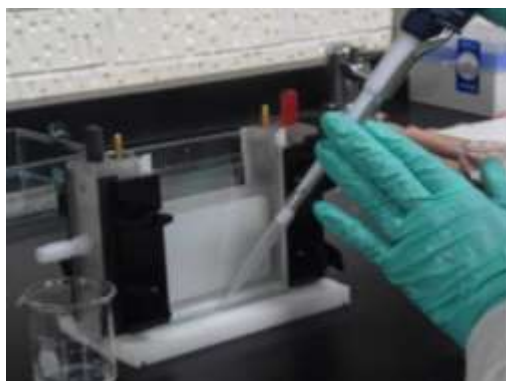


Fig. 7. Colocación del sello de
agarosa en la base del soporte
de la cámara

2. Preparación del gel.

a. Para señalar la línea de llenado del gel separador, colocar el peine separador de pozos adecuado y marcar una línea 1cm hacia abajo a partir del peine (Fig. 8). Retirar el peine.

b. Preparar el gel separador al 10% en un tubo plástico de 50 mL con las cantidades y en el orden en que se muestran en la siguiente tabla:

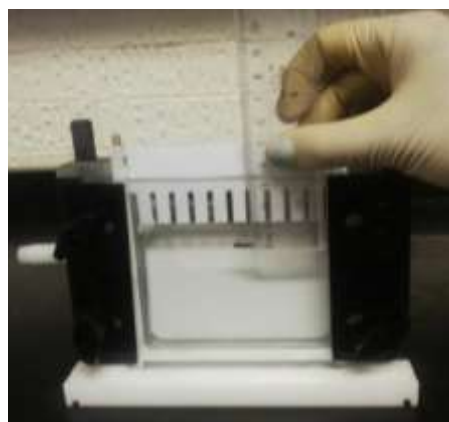


Fig. 8. Marcando línea de llenado.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	181 /284

Gel separador (5 mL)	
Reactivo	Cantidad (mL)
Agua destilada	1.9
Acrilamida- bisacrilamida 30%	1.7
TRIS 1.5M pH 8.8	1.3
SDS 10%	0.05
Persulfato de amonio 10%	0.05
TEMED	0.002

c. (Fig. 9), inmediatamente colocar sobre el gel una capa de agua, evitando mezclar las dos fases (H_2O /poliacrilamida) para que no entre aire durante la polimerización del gel (Fig. 10).

Nota: Es importante la rapidez del llenado, de lo contrario el gel polimerizará en el tubo.



Fig. 9. Llenado con el gel separador

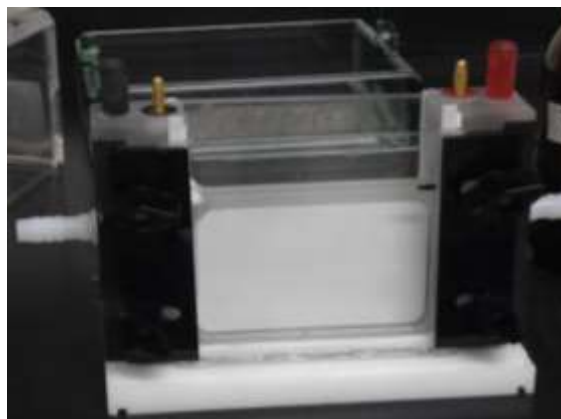


Fig. 10. Gel separador con capa de agua

d. Cuando el gel haya polimerizado (Fig. 11), secar el exceso de agua inclinando un poco la cámara e introduciendo entre los vidrios un papel filtro para absorberla (Fig. 12). **Nota:** Se puede observar la polimerización con el sobrante en el tubo donde se preparó el gel.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	182 /284

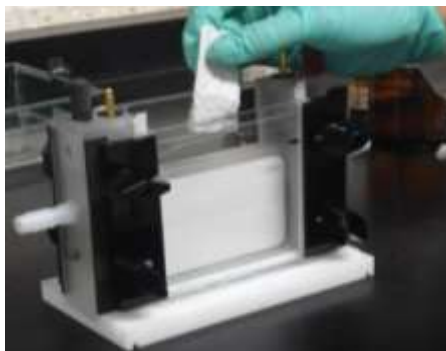


Fig. 11. Polimerización del gel



Fig. 12. Absorción del agua

e. Preparar el gel concentrador con las cantidades de la siguiente tabla.

Gel concentrador (3 mL)	
Reactivo	Cantidad (mL)
Agua destilada	2.1
Acrilamida- bisacrilamida 30%	0.5
TRIS 1.5M pH 6.8	0.38
SDS 10%	0.03
Persulfato de amonio 10%	0.03
TEMED	0.003

f. Mezclar rápidamente y adicionar sobre el gel separador. Inmediatamente colocar el peine para formar los carriles donde se pondrán las muestras (Fig. 13).

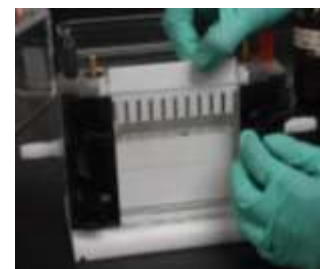


Fig. 13. Colocación del Peine

Nota: Es importante la rapidez de llenado, de lo contrario el gel polimerizará en el vaso.

Fig. 13. Colocación del Peine



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	183 /284

g. Una vez polimerizado el gel, colocar la “cámara del amortiguador superior” con el gel preparado dentro de la “cámara de amortiguador inferior” asegurándola en las ranuras de alineamiento de la “cámara inferior”. Retirar el peine (Fig. 14).

h. Llenar con buffer de electroforesis 1X, la “cámara superior” hasta donde se marca el final del vidrio de las muescas (Fig. 15).

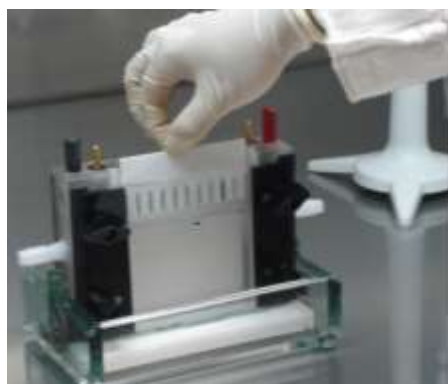


Fig. 14. Alineamiento de la cámara y retiro del peine

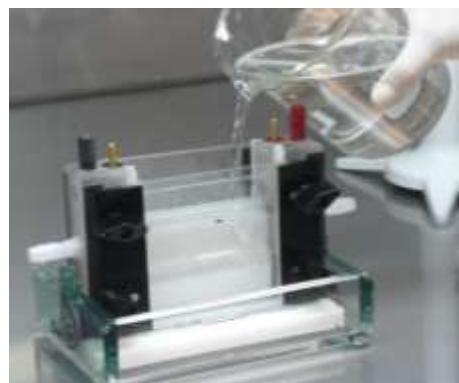


Fig. 15. Llenado de la cámara

3. Preparación de las muestras

- Diluir las muestras de proteínas que se van a utilizar en la electroforesis de proteínas con hidróxido de sodio 0.1 N.
- A 20 μ L de cada muestra diluida (plasma y/o suero, albúmina y globulinas) adicionarles 12.5 μ L de buffer de Laemli y mezclar. Hervir por 5 minutos y cubrir de la luz cuando se saquen del baño.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	184 /284

c. Colocar en el primer pozo 5 μ L del marcador de peso molecular y en los pozos siguientes 25 μ L de muestra con micropipeta con punta especial (Fig. 16), si algún pozo no tiene muestra colocar 25 μ L del buffer de Laemli.

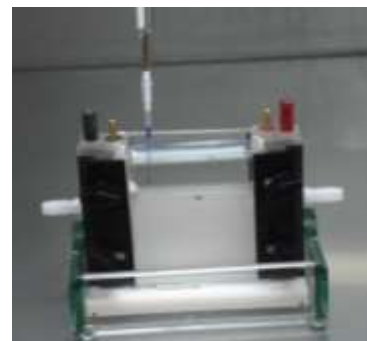


Fig. 16 Carga de muestras en el gel

d. Al terminar de colocar todas las muestras (Fig. 17), llenar la “cámara superior” con buffer de electroforesis 1X hasta el tope, asimismo colocar buffer en la “cámara inferior” hasta la marca, cuidando cubrir los dos electrodos (Fig. 18).

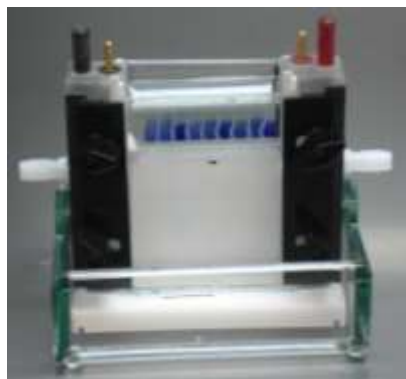


Fig. 17. Cámara con las
muestras cargadas

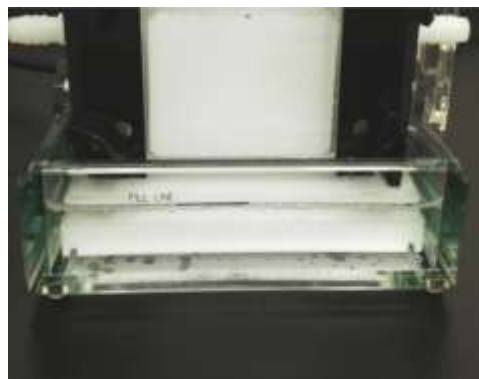


Fig. 18. Cámara inferior con
buffer



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	185 /284

e. Cerrar la cámara y conectarla a la fuente de poder en los electrodos correspondientes al color (Fig. 19). Permitir el corrimiento de electroforesis a 85V por aproximadamente 30 minutos esperando que las muestras se compacten y entren al gel y después aumentar el voltaje a 100V cuando las muestras lleguen a la marca del gel de separación y correr durante aproximadamente 3 horas.



Fig. 19. Cámara de electroforesis conectada a la fuente de poder.

4. Tinción del gel.

a. Una vez transcurrido el tiempo, apagar la fuente de poder, desconectar la cámara de la fuente de poder, quitar la tapa de seguridad y sacar la “cámara de buffer superior” para quitar el buffer (Fig. 20).

b. Retirar los vidrios de la cámara y quitar cuidadosamente los separadores (Fig. 21) de las orillas para separar el vidrio de deslizamiento del vidrio con muescas (Fig. 22) y eliminar con una espátula de plástico el gel concentrador (Fig. 23).

Nota: Cuidado de no rayar el vidrio (utilizar un recipiente de plástico para contener el gel).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	186 /284

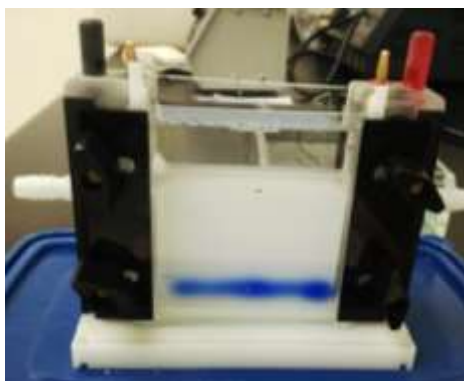


Fig. 20. Retirar el buffer

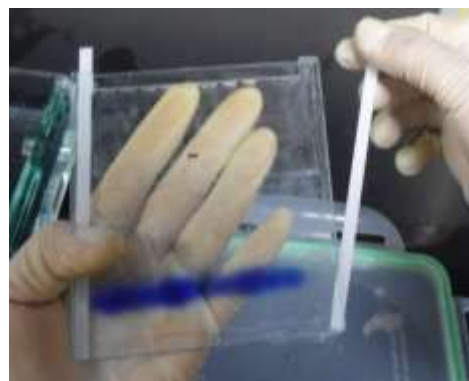


Fig. 21. Retirado de los separadores



Fig. 22. Colocación del gel en una caja.

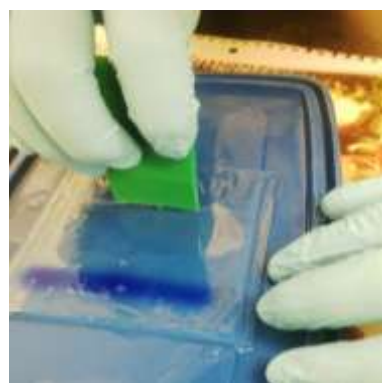


Fig. 23. Retiro del gel concentrador

c. Enjuagar el gel con un poco de buffer de electroforesis, posteriormente retirar todo el buffer y cubrir el gel separador con una solución de Azul de Comassie, mantener durante 1 hora en movimiento para teñir las bandas de proteínas (Figs. 24 y 25).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	187 /284

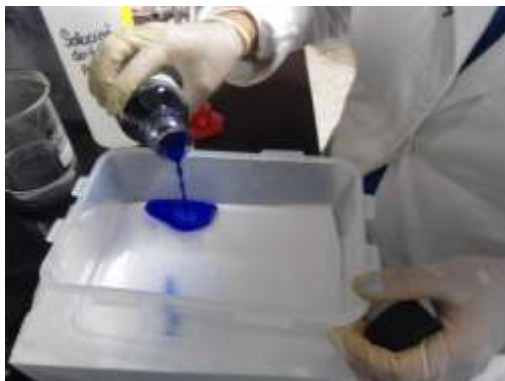


Fig. 24. Cubrir el gel
separador con solución Azul
de Coomassie



Fig. 25. Equipo de movimiento
con recipiente donde se
encuentra el gel

d. Retirar la solución de tinción con una pipeta y desteñir el gel con solución desteñidora para limpiar las zonas que no presentan bandas de proteínas (Figs. 26 y 27).

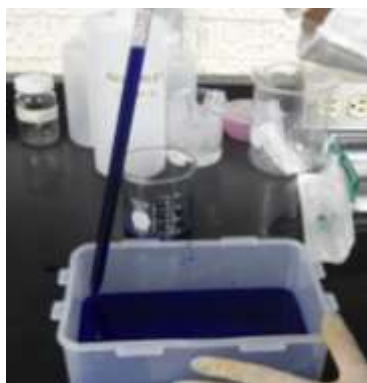


Fig. 26. Retirado de la solución de
teñido

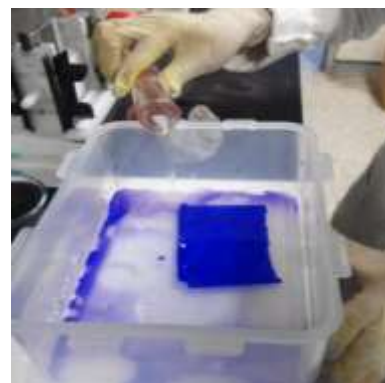


Fig. 27. Gel con la solución para
desteñir

Fig. 26. Retirado de la solución de
teñido

Fig. 27. Gel con la solución para
desteñir



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	188 /284

e. Quitar el exceso de solución desteñidora y observar las bandas de cada muestra (Ver ejemplo en Fig. 28.)

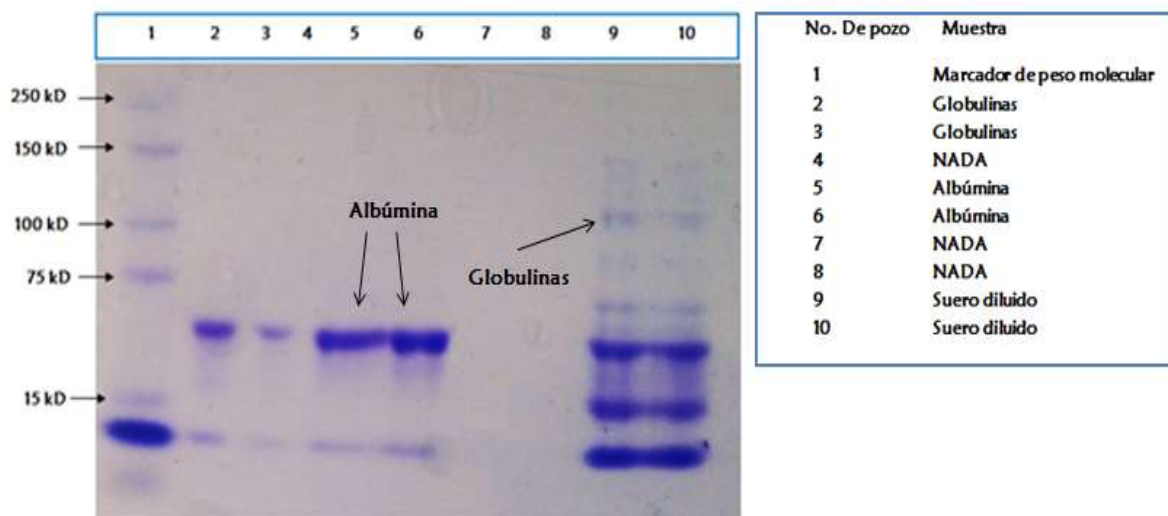


Fig. 28. Ejemplo de separación de proteínas obtenido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	189 /284

Resultados

- Comparar en el gel las bandas obtenidas en los carriles de sus tres muestras contra la escalera de peso molecular conocido.
- Investigar el peso molecular esperado para la albúmina y los cuatro grupos de globulinas y analizar si coinciden con los pesos moleculares determinados por comparación con la escalera de peso molecular conocido.

Cuestionario

1. ¿Cuál es el gel más utilizado para realizar electroforesis de proteínas plasmáticas?
2. ¿Qué otros métodos de separación de proteínas existen además de la electroforesis de proteínas?
3. ¿Cómo modificaría la concentración del gel para separar los distintos grupos de globulinas?
4. ¿Es posible cortar las bandas obtenidas y extraer las proteínas contenidas? ¿Cómo?, ¿Para qué?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	190 /284

Referencias

1. Faller A. Schunke M. Estructura y función del cuerpo humano, España: Paidotribo; 2006.
2. Lodish H, et al. Biología celular y molecular. 5ª Ed. México: Médica Panamericana. 2009.
3. McKee T, Makee J. Bioquímica: Las bases moleculares de la vida. 4ª Ed. España: McGraw Hill Interamericana; 2009.
4. Owner's Manual. The Joey™ Gel Caster Models JGC-4, JGC-2, and JGC-3. Owl Separation System. JGC4,2,3-061502. 2002.
5. Pertierra A, Rivera J, Fundamentos de Bioquímica Estructural 2da. Ed. Madrid: Tébar; 2006.
6. Silbernagl A, Agamemnon, Fisiología: texto y atlas, 7ª Ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2009.
7. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
8. Zamora S, Llamas F, Nutrición y alimentación humana. España: Universidad de Murcia; 2002.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	191 /284

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE GERMEN DE TRIGO

Objetivos

- ✓ Analizar el fundamento de la obtención y purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- ✓ Obtener y Purificar ADN de germen de trigo
- ✓ Evaluar el grado de pureza del ADN obtenido.

Antecedentes académicos

- ✓ Estructura del ADN.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas del ADN.
- ✓ Técnicas de extracción y purificación del ADN.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	192 /284



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	193 /284

Introducción

El ADN está formado por dos cadenas de polinucleótidos enrolladas una alrededor de la otra para formar una doble hélice. Cada nucleótido monómero del ADN está formado por una base nitrogenada (púrica o pirimidínica), un azúcar desoxirribosa y fosfato. Los mononucleótidos están unidos mediante enlaces 3,5-fosfodiéster. Estos enlaces unen el grupo 5-hidroxilo de la desoxirribosa de un nucleótido con el grupo 3-hidroxilo del azúcar de otro nucleótido mediante un grupo fosfato. La orientación antiparalela de las dos cadenas de polinucleótidos permite que se formen enlaces de hidrógeno entre las bases nitrogenadas que están orientadas hacia el interior de la hélice.

Existen dos clases de apareamiento de bases en el ADN: la adenina se aparea con la timina a través de dos enlaces de hidrógeno y la guanina con la citosina con tres enlaces. Debido a que cada par de bases está orientado en ángulo con el eje largo de la hélice, la estructura global del ADN se parece a una escalera de caracol.

- **Técnicas de extracción y purificación de ADN**

Las técnicas que se utilizan para el aislamiento, purificación y caracterización de las biomoléculas aprovechan sus propiedades físicas y químicas. La mayoría de las técnicas que se emplean en la investigación sobre los ácidos nucleicos se fundamentan en las diferencias de peso molecular, secuencias de bases o apareamiento complementario de bases. Las técnicas como la cromatografía, la electroforesis y la ultracentrifugación, que se han utilizado con éxito en la investigación proteica, se han adaptado también para su uso con los ácidos nucleicos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	194 /284

Los ácidos nucleicos en las células se encuentran invariablemente asociados con proteínas. Una vez que las células han sido lisadas, los ácidos nucleicos requieren ser disociados de las proteínas. Esto puede lograrse por medio de la agitación de la mezcla proteína-ácidos nucleicos con una solución de fenol, de modo que las proteínas se precipiten y puedan eliminarse por centrifugación. En forma alternativa, las proteínas pueden disociarse de los ácidos nucleicos por medio de detergentes, cloruro de guanidinio o alta concentración de sal, o pueden degradarse enzimáticamente por proteasas.

Podemos encontrar métodos que aprovechan las propiedades desnaturizantes que tienen ciertos disolventes orgánicos como cloroformo, fenol, etc. y aquellos fundamentados en el cambio de solubilidad que experimentan las proteínas cuando son sometidas a modificaciones en la concentración salina del medio. Así, en presencia de bajas concentraciones de sales, existe un ligero aumento en la solubilidad de las proteínas (salting-in) por aumento de la fuerza iónica del medio respecto de soluciones acuosas. Por otro lado, en presencia de altas concentraciones de sales, la solubilidad de las proteínas disminuye y terminan por precipitar (salting-out).

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos del resto de las células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (tritución, lisis hipotónica, etc.)
- Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.)
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	195 /284

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que solubilizan las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactiven las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación.

Para prevenir que el ADN extraído presente coloración gris o parda, la cual se debe a la actividad de polifenoloxidasas presentes en algunos tejidos, se puede incluir en el buffer de extracción PVP (polivinil pirrolidona).

El ADN es insoluble en alcohol, por lo que se puede precipitar en etanol frío o isopropanol y recuperar mediante centrifugación.

Las fuerzas de unión que mantienen juntas las cadenas complementarias del ADN pueden romperse. Este proceso, se denomina desnaturalización, se estimula por el calor, las concentraciones salinas bajas y los valores de pH extremos.

- **Técnicas que explotan las características estructurales singulares de los ácidos nucleicos.**

Diversas propiedades singulares de los ácidos nucleicos (p. ej., absorción de la luz UV de longitudes de onda específicas y su tendencia a formar reversiblemente complejos de doble cadena) se explotan en la investigación de los ácidos nucleicos. Las bases púricas y pirimidínicas absorben la luz UV debido a sus estructuras aromáticas. Debido a esta característica es posible cuantificar el ADN a 260 nm, ya que una unidad de absorbancia equivale a 50 µg/mL de ADN; asimismo para evaluar la pureza del ADN se utilizan las relaciones de absorbancia a 260/230 y 260/280.

- **Efecto hipercrómico.**

La desnaturalización del ADN se puede detectar observando el aumento de la capacidad de una disolución de ADN de absorber la luz ultravioleta de una



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	196 /284

longitud de onda (λ) de 260 nm (A260). Las bases de los ácidos nucleicos absorben fuertemente la luz de 260 nm. La cantidad de luz que absorbe un número de bases dado depende de su proximidad. Cuando las bases están altamente ordenadas (muy próximas entre sí) como en el ADN de doble hebra, la A260 es menor que en un estado menos ordenado como el ADN de una sola hebra o las bases nitrogenadas libres en disolución.

Material y Equipo

- Mortero con pistilo.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Agitador de vidrio.
- Embudo de tallo corto
- Gasa estéril.
- Frasco ambar de tapón esmerilado de 250 mL. Tubos de ensaye de 13 X 100.
- Centrífuga.
- Micropipetas P200, P1000, P5000 μ L
- Puntas nuevas y estériles para las micropipetas.
- Vidrio de reloj.
- Biofotómetro.
- Celda para biofotómetro.
- Recipientes para baño de agua y baño de hielo.
- Pipetas Pasteur.
- Parrilla de agitación y calentamiento.
- Termómetro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	197 /284

Material Biológico

- Germen de Trigo

Reactivos

- Etanol absoluto.
- Amortiguador TSM: TRIS 0.1 M, Sacarosa 0.3 M, Cloruro de magnesio 0.005M y Mercaptoetanol 0.005M (PM= 78, densidad 1.114 g/mL).
- TRIS base 0.4 M pH 8.5
- EDTA salino pH 8: EDTA 0.1 M y Cloruro de sodio 0.15M.
- SDS o LSS: Lauril sulfato de sodio al 4% en agua (p/v).
- Amortiguador CSC: Citrato de Sodio 0.15M y Cloruro de sodio 1.5M.
- Amortiguador DSC. Dilución 1:100 del amortiguador CSC.
- Mezcla Sevag: Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Difenilamina: Disolver 1.5g de Difenilamina en 100 mL de ácido acético concentrado y agregar 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (guardar en frasco ámbar).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	198 /284

Método

1. Moler en un mortero 2.5 g de germen de trigo junto con un trozo de hielo seco hasta homogeneizar (Figs. 1 y 2).



Figs. 1 y 2. Moler con hielo seco

2. Pasar este homogeneizado a un vaso de precipitados de 100 mL, añadir 25 mL de amortiguador TSM, homogeneizar con un agitador de vidrio y colocar un trozo pequeño de hielo seco (Fig. 3).



Fig.3. Homogenizado en
vaso de precipitados

3. Dejar congelar por 10 minutos y descongelar en un baño de agua a temperatura ambiente (fig.4).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	199 /284



Fig.4. Congelación (izquierda) y descongelación (derecha) de la muestra

4. Filtrar este homogenizado sobre un trozo de gasa y exprimirla con la ayuda de un embudo, pasar el líquido filtrado a 3 tubos de ensaye.
5. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, desechar el sobrenadante y agregar a cada tubo: 6 mL de amortiguador TRIS, 0.6mL de EDTA salino y 1.2 mL de CSC, mezclar bien y añadir 2 mL de LSS.
6. Mezclar y centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos. Verter el sobrenadante lentamente por las paredes de un vaso que contenga 60 mL de etanol absoluto frío (Fig.5).



Fig. 5. Sobrenadante trasvasado a un recipiente con etanol frío



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	200 / 284

7. El ADN aparecerá como una nata ascendente que puede recuperarse con una varilla de vidrio o por centrifugación (fig.6).



Fig.6. Precipitación de ADN.

8. Una vez obtenido el ADN, proceder a su purificación. La nata se coloca en un vidrio de reloj (fig.7), se deja secar en la campana de extracción, posteriormente disolver la nata con la mínima cantidad de DSC, pasar a un frasco de tapón esmerilado, agregar la cantidad necesaria de cloruro de sodio para obtener una concentración de 1 M (no considerar la concentración de NaCl que contiene el DSC). Añadir un volumen igual de la mezcla Sevag y agitar fuertemente contra las paredes de un frasco de tapón esmerilado durante 15 minutos (Fig. 8).



Fig. 7. Nata de ADN



Fig. 8. Agitación en frasco esmerilado

Nota: Durante la agitación destapar el frasco para permitir la salida de los gases generados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	201 /284

9. Centrifugar el líquido a 3000 rpm durante 5 minutos, se obtendrán tres fases, en la superior el ADN purificado, en la media las proteínas precipitadas y en la inferior la mezcla Sevag.

10. Tomar la capa superior de cada tubo con una pipeta Pasteur y verterla en un vaso que contenga 60 mL de etanol absoluto frío. Nuevamente ascenderá una nata de ADN que se recuperará para evaluar su pureza, y efecto hipercrómico.

11. Recuperar la nata de ADN en un vidrio de reloj y dejar secar en la campana de extracción, disolver en la cantidad mínima de DSC, si es necesario calentar un poco sin exceder 50°C.

A partir de este momento se realizarán los siguientes experimentos:

A) **Cuantificación y Pureza.** Con la solución del paso 11 determinar la concentración: Tomar 100 μ L de la solución de ADN y adicionar 900 μ L de DSC. Asimismo, evaluar la pureza en el espectrofotómetro, obteniendo las relaciones de absorción en ultravioleta 260/230 y 260/280. Utilizar como blanco DSC (Fig. 9).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	202 /284



Fig. 9. Biofotómetro.

- B) **Efecto hipercrómico.** Calentar gradualmente la solución anterior hasta 75-80°C en baño María durante 5 minutos, enfriar rápidamente en un baño de hielo y volver a medir la absorción a 260 nm para observar el efecto hipercrómico.
- C) **Reacción de la Difenilamina.** Utilizar un mililitro de la solución de ADN, agregar 1 mL de ácido tricloroacético al 10% y 1 mL de la solución de Difenilamina; hacer otro tubo como blanco de reactivos, taparlos con una canica para evitar la evaporación y colocarlos en baño María a ebullición durante 15 minutos. Observar un color azul característico debido a la presencia de desoxirribosa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	203 /284

Resultados

- Cuantificar el ADN obtenido con el biofotómetro a 260 nm.
- Evaluar la pureza del ADN obtenido de acuerdo a las lecturas hechas a 260/280 nm y 260/230 en el biofotómetro.
- Interpretar los resultados del efecto hipercrómico.
- Interpretar los resultados de la reacción con la difenilamina.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de la molécula de ADN?
2. Describa el fundamento para la obtención de ADN en germen de trigo.
3. ¿Para qué se utiliza la mezcla Sevag?
4. ¿Qué importancia tiene la relación de absorbancias de 260/280 nm y 260/230 nm?
5. ¿Por qué y qué se lee a 230 y 280 nm?
6. Escriba la reacción de la desoxirribosa con la difenilamina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	204 /284

Referencias

1. Andrés I, nucleótidos y ácidos nucleicos. Universidad de Cantabria. Disponible en: ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/bioquimica/material-de-clase-1/Tema10_nucleotidos.pdf.
2. Cariaga E, Zapata D. El laboratorio de Biología Molecular. Una guía práctica. Colección: cuadernos de Cátedra. Ed. Universitaria de Misiones; 2005.
3. Lozano J, Galindo J, García-Borron J, Martinez-Liarte J, Peñafiel R, Solano F. Bioquímica para ciencias de la salud. España: McGraw-Hill; 1995.
4. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
5. QIAGEN. Sample & Assay Technologies. Technical hints, applications, and protocols. Genomic DNA purification. P. 10-11. [on line]. Disponible en en1.qiagen.com/literature/brochures/Gen_DNA_Pur/1019469_BROS_DN_YTi_INT_0502.pdf.
6. Rogers S.O., Bendish A.J., Extracción of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual. 1988. 4(6):1-10.
7. Velasco R., Facultad de Ciencias Agropecuarias. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. 2005. 3(1):14-18. [on line]. Disponible en: unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art32.pdf.
8. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	205 / 284

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN HUMANO

Objetivos

- ✓ Analizar el fundamento de la extracción de ADN.
- ✓ Extraer el ADN de una muestra de sangre humana utilizando el equipo de reactivos “Wizard® Genomic DNA Purification”.
- ✓ Revisar las distintas aplicaciones que tiene la obtención de ADN.

Antecedentes académicos

- ✓ Función del ADN.
- ✓ Estructura del ADN.
- ✓ Propiedades fisicoquímicas del ADN.
- ✓ Métodos de extracción y purificación del ADN.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	206 /284

Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero que contiene varios millones de pares de nucleótidos organizados siguiendo una secuencia lineal, en el humano consta de aproximadamente 3000 millones, en los que se encuentra la información genética. La molécula de ADN presenta diferentes grados de compactación de la cromatina durante la interfase del ciclo celular. Las secuencias codificantes del ADN se conocen con el nombre de genes que son transcripcionalmente activas y se encuentran en la cromatina menos condensada, eucromatina, mientras que la cromatina altamente condensada, heterocromatina, es en apariencia genéticamente inactiva. El ADN se duplica de forma semi-conservativa, durante el periodo S del ciclo celular, replicando la eucromatina tempranamente y la heterocromatina más tarde. El nucléolo es una estructura basófila que se encuentra en el núcleo de eucariontes que corresponde al sitio donde se expresan los genes que codifican para los ARN ribosomales. La molécula de ADN se forma por enlace covalente de miles de desoxinucleótidos. El desoxinucleótido, o unidad estructural del ADN, contienen un ácido fosfórico, un azúcar de cinco átomos de carbono o pentosa y una base nitrogenada.

El ADN contiene cuatro bases nitrogenadas: adenina (A) y guanina (G), que derivan de la purina y citosina (C) y timina (T) que derivan de la pirimidina (Fig.1). El enlace pentosa que es una desoxirribosa y una base nitrogenada forma una molécula denominada desoxinucleósido. La unión de un ácido fosfórico a esta molécula forma el desoxinucleótido.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	207 / 284

Los desoxinucleótidos se unen para formar el polímero lineal, en el cual el grupo fosfato en posición 5' de la desoxirribosa se une por un enlace éster con el hidroxilo 3' de la desoxirribosa del desoxinucleótido vecino, y así sucesivamente (Fig. 2).

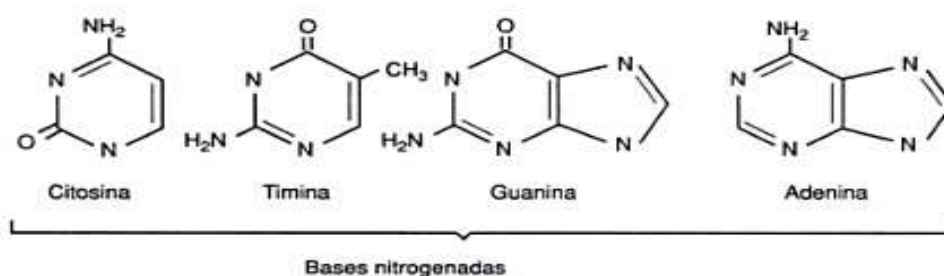


Fig. 1 Estructura química de las cuatro bases nitrogenadas que componen el ADN humano

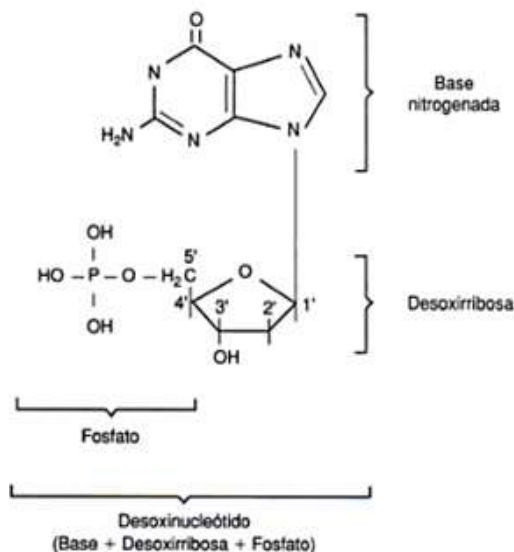


Fig. 2 Esquema del enlace químico que forma el polímero lineal de un desoxinucleótido



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	208 /284

El polímero forma una hebra donde se alternan una desoxirribosa y un fosfato, mientras que las bases se unen perpendicularmente a éste (Fig.3). La proporción relativa de cada una de las bases del ADN, así como el orden o secuencia en que se encuentran, varía de organismo a organismo, ya que la secuencia de bases es específica para cada uno, y contiene la información genética que lo define.

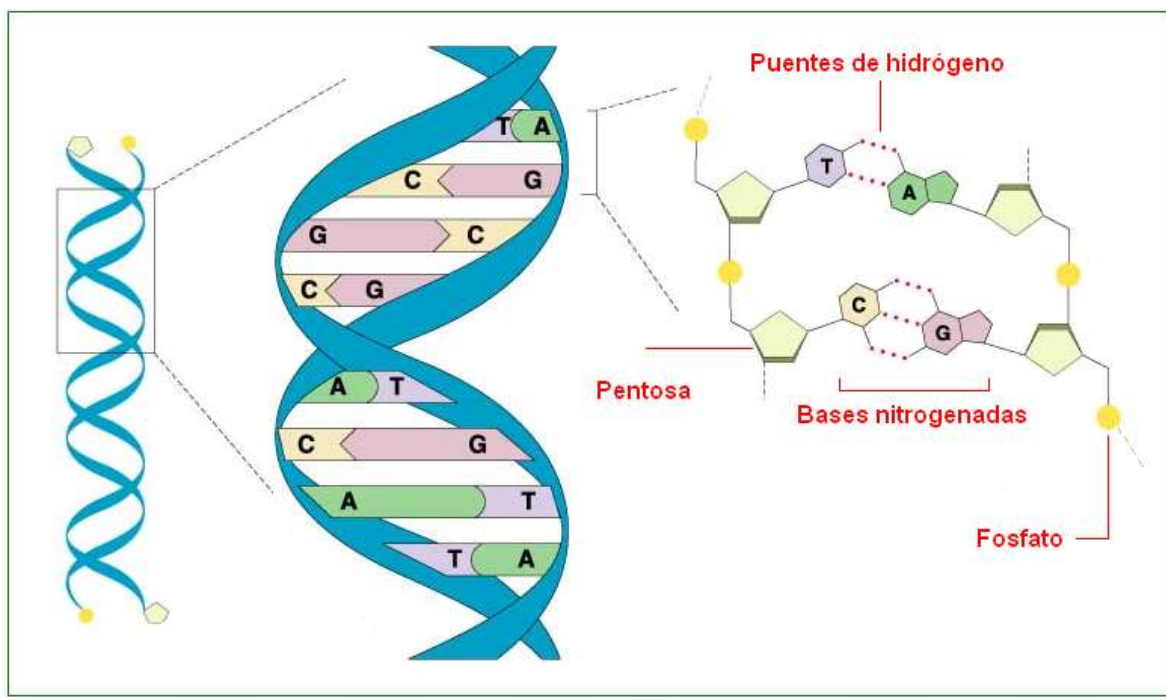


Fig. 3 Estructura secundaria del ADN

Extracción y purificación

El primer paso en cualquier análisis genético suele ser el aislamiento del material genético. Los métodos de extracción del ADN se remontan a 1869



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	209 /284

cuando Miescher consiguió extraer del esperma de salmón y de los leucocitos humanos lo que entonces denominó nucleína y que hoy es el ADN. Para aislar el ADN a partir de una muestra de sangre se procede a lisis de los eritrocitos con choque hipotónico y en presencia de detergentes para eliminar el exceso de hemoglobina. Después se tratan los núcleos de los leucocitos con proteinasa K y se procede a la purificación del ADN a través de la extracción clorofórmica de las proteínas y precipitación del ADN con etanol.

El ADN extraído de esta forma es apto para la mayoría de los análisis moleculares. A parte de este método existen numerosas variantes metodológicas para purificar el ADN dependiendo de los distintos materiales de partida (sangre, tejidos, bacterias, levaduras) basados en solubilidad o precipitación diferencial de ADN o basados en su afinidad a distintos tipos de matrices.

Normalmente el ADN se extrae a partir de muestras que contienen células nucleadas, ya que en el núcleo es donde está el ADN genómico. No obstante en algunos métodos se analiza el ADN circulante presente en el plasma, que es un ADN degradado en forma de fragmentos del tamaño del mononucleosoma, y que procede de los fenómenos apoptóticos que ocurren en distintos tejidos del organismo.

Material y Equipo

- Tubos Vacutainer® con EDTA (tapón lila)
- Soporte de aguja
- Aguja para toma múltiple 21G x 38 mm
- Torundas
- Ligadura



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	210 /284

- Guantes de latex
- Microtubos de 1.5mL
- Tubos de 15 mL
- Equipo de reactivos “ Wizard® Genomic DNA Purification”
- Micropipetas p1000 y p5000 µL
- Puntas nuevas para las micropipetas
- Recipiente para baño de agua
- Termómetro
- Centrífuga
- Vortex
- Parrilla de calentamiento

Reactivos

- Isopropanol
- Etanol al 70%

Reactivos del Kit Wizard® Genomic DNA

- Solución de lisis celular (Cell Lysis Solution).
- Solución de lisis de núcleos (Nuclei Lysis Solution).
- Solución de precipitación de proteínas (Protein Precipitation Solution).
- Solución RNasa (RNase Solution)
- Solución de rehidratación de ADN (DNA Rehydration Solution)

Material Biológico

-Sangre humana venosa



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	211 /284

Método

-Extracción de ADN genómico a partir de un volumen de 3 mL de una muestra de sangre humana.

1. Realizar la técnica de extracción sanguínea de un integrante del equipo para obtener una muestra en un tubo que contenga anticoagulante EDTA (tapón color lila).
2. Utilizar un volumen de 3 mL de la sangre previamente mezclada y añadirla a un tubo de 15ml que contiene 9 mL de solución de lisis celular. Mezclar de 5 a 6 veces.
3. Incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invertir de 2-3 veces durante la incubación) para lisar las células rojas de la sangre y centrifugar a 3500 rpm ($2,000 \times g$) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Retirar y desechar la mayor cantidad posible de sobrenadante sin perturbar el sedimento visible blanco. Aproximadamente de 50–100µL de líquido residual deben permanecer en el tubo. Si la pastilla parece contener sólo las células rojas de la sangre, añadir una alícuota adicional (1mL) de solución de lisis celular después de retirar el sobrenadante por encima del sedimento de células, y luego repetir los pasos 3 y 4.
5. Nota: para obtener la lisis celular eficiente, resuspender completamente las células blancas de la sangre.
6. Agitar el tubo vigorosamente en el vortex hasta que las células blancas de la sangre se vuelven a suspender (10-15 segundos).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	212 /284

7. Agregar 3 mL de solución de lisis de núcleos al tubo que contiene las células resuspendidas. Pipetear la solución 5-6 veces para lisar las células blancas. La solución se observará muy viscosa (Fig. 4).

Nota: Si algunos grumos de células son visibles después de la mezcla, se debe de incubar la solución a 37°C hasta que se rompan los grumos. Si éstos todavía son visibles después de 1 hora, añadir 1 mL de solución de lisis de núcleos y repetir la incubación.



Fig. 4 Formación de la solución viscosa

8. **OPCIONAL.** Agregar 15 µL solución RNasa, al lisado nuclear, y mezclar la muestra invirtiendo el tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37 ° C durante 15 minutos, y después enfriar a temperatura ambiente.

9. Añadir 1mL de la solución de precipitación de proteína al lisado nuclear y agitar vigorosamente durante 10 a 20 segundos. Pequeños grupos de la proteína pueden ser visibles después de agitación (Fig. 5).

NOTA: Si se adicionó un exceso de solución de lisis de núcleos en el paso 6, deberá adicionar 1.3 mL de solución de precipitación de proteínas.



Fig. 5 Precipitación de proteínas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	213 /284

10. Centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Deberá observarse un color marrón oscuro del botón de proteínas (Fig.6).



Fig. 6 Botón de proteínas

11. Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifugación de 15 mL que contiene 3 mL de Isopropanol a temperatura ambiente. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta observar las hebras de color blanco que corresponden al ADN (Fig. 7).



Fig. 7. ADN precipitado

12. Centrifugar a 3500 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. El ADN será visible como un pequeño precipitado blanco (Fig. 8).



Fig. 8. Botón de ADN

13. Decantar el sobrenadante, y añadir 3 mL de etanol al 70% a temperatura ambiente. Invertir suavemente el tubo varias veces para lavar el sedimento de ADN y los lados del tubo en donde está el ADN. Centrifugar como en el paso 11.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	214 /284

14. Aspirar cuidadosamente el etanol utilizando una pipeta Pasteur. NOTA: El sedimento de ADN no es compacto en este punto por lo que se debe tener cuidado para evitar la aspiración del botón con la pipeta. Invertir el tubo sobre un pedazo de papel adsorbente y dejar secar al aire durante 10 minutos (Fig.9).



Fig. 9 Secado del ADN

15. Añadir 250 μ L de la solución de rehidratación de ADN al tubo y rehidratar el ADN mediante incubación a 65°C durante 1 hora. Periódicamente mezclar la solución golpeando suavemente el tubo. Almacenar el ADN a 2-8 °C hasta su uso. Alternativamente se puede rehidratar el ADN mediante la incubación de la solución durante la noche a temperatura ambiente o a 4°C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	215 /284

Resultados

- Describir los cambios físicos que se presentan en cada uno de los pasos de la extracción y purificación de ADN.

Cuestionario

1. ¿Qué función tiene la RNasa en la técnica de obtención de ADN?
2. ¿Para qué sirve cada uno de los reactivos que se ocupan en la extracción de ADN?
3. ¿Por qué se recomienda que el material que se ocupa debe de ser estéril?
4. ¿De qué otro tipo de células se podría obtener ADN?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	216 /284

Referencias

1. Campbell MK, Farrell SO. Bioquímica. 6a ed. México DF: Cengage Learning; 2010.
2. González-Morán MG. Técnicas de Laboratorio en biología celular y molecular. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor S.A.; 2008.
3. Jiménez L, Merchant H. Biología celular y molecular. México: Pearson Educación; 2003.
4. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.
5. Technical Manual. "Wizard® Genomic DNA Purification Kit". TM050. USA: Promega Corporation; 2010.
6. Virgili O. El Genoma humano. Nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento. Barcelona: Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona; 2006.
7. WizardGenomic DNA Purification Kit Quick Protocol. 9FB022. USA: Promega Corporation; 2010.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	217 /284

CUANTIFICACIÓN DE ADN HUMANO

Objetivos

- ✓ Cuantificar el ADN de una muestra problema, por el método espectrofotométrico, utilizando un biofotómetro.
- ✓ Determinar la pureza del ADN extraído de la práctica anterior.

Antecedentes académicos

- ✓ Características fisicoquímicas del ADN.
- ✓ Funcionamiento del equipo BioPhotometer®.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	218 /284

Introducción

La concentración del ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260nm, debido a que las bases púricas y pirimídicas del ADN tienen propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda. Es importante tener en cuenta que, dado el emparejamiento de sus bases (puentes de hidrógeno), el ADN bicatenario absorbe menos que el monocatenario. Es así como una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260nm equivale a 50µg/mL de ADN de doble cadena, a 40µg/mL de ARN y ADN de cadena simple.

La concentración del DNA en una muestra puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de DNA } (\mu\text{g} / \text{mL}) = \text{absorbancia de la muestra a 260nm} \times \text{factor de dilución} \times 50\mu\text{g/mL}$$

El análisis espectrofotométrico también permite valorar el grado de pureza de los ácidos nucleicos, mediante el cociente de lecturas de absorción a 260 nm (bases nitrogenadas) y las lecturas a 280 nm que corresponden al máximo de absorbancia de las proteínas y lecturas de 230 nm máximo de absorbancia de carbohidratos, Debe considerarse que la pureza y concentración de ADN, puede alterarse por los reactivos utilizados para la extracción.

La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de las absorbancias a 260 y 280nm.

$$\text{Pureza ADN} = \text{absorbancia 260 nm} / \text{absorbancia 280 nm}$$

Se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan un cociente de 1.7 a 2, cocientes menores indican la presencia de proteínas en el medio y cocientes mayores indican la presencia de otras sustancias contaminantes como etanol.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	219 /284

Efecto hipercrómico

Cuando una solución de ADN de doble hebra se calienta por encima de una temperatura determinada, su estructura nativa colapsa y sus dos hebras complementarias se separan y asumen conformaciones al azar. Este proceso de desnaturalización está acompañado de un cambio cualitativo de las propiedades físicas del ADN, por ejemplo, la alta viscosidad característica del ADN nativo en solución, debida a la resistencia a la deformación de sus moléculas dobles rígidas y con forma de rodillo, disminuye de manera drástica cuando el ADN se descompone en las hebras simples de conformación flexible. De modo similar, la absorbancia del ADN a la luz ultravioleta que se debe casi por completo a sus bases aromáticas, aumenta en un 40% al desnaturalizarse como consecuencia de la desnaturalización de las interacciones electrónicas entre las bases vecinas. El aumento de la absorbancia se conoce como efecto hipercrómico.

Al monitoriar los cambios en la absorbancia a 260nm de una muestra de ADN, se observa que a medida que la temperatura aumenta se revela un incremento en la absorbancia, esto tiene lugar en un rango estrecho de temperatura, lo que indica la desnaturalización del ADN como un fenómeno cooperativo en el que el colapso de una parte de la estructura desestabiliza al resto.

En la forma análoga a la fusión de un sólido, hace referencia a la curva de fusión (Fig. 1) y la temperatura de su punto medio se define como su temperatura de fusión T_m .

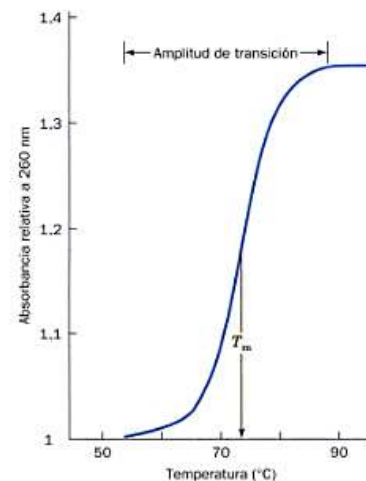


Fig.1 Ejemplo de una curva de fusión



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	220 /284

La estabilidad del ADN y por consiguiente su T_m , dependen de varios factores, por ejemplo, la naturaleza del solvente, las identidades y las concentraciones de los iones en solución y el pH.

Material y Equipo

- Equipo BioPhotometer®
- Celdas
- Micropipetas p200, p1000 y p5000 μL
- Puntas nuevas para micropipetas
- Agua destilada
- Guantes de látex
- Gradilla
- Vasos de precipitados de 50 mL

Material Biológico

-Muestras de ADN humano



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	221 /284

Método

1. Preparar 200 μ L con una dilución 1:20 de la muestra con agua destilada (Fig. 2) (Fig. 3) (si la lectura es muy alta diluir 1:40).



Fig. 2 Mezcla de la muestra de
ADN

Fig. 2 Mezcla de la muestra de
ADN



Fig. 3 Preparación de la
dilución

2. Encender el equipo (Fig. 4) del botón que se encuentra en la parte posterior del equipo y seleccionar la función No. 7 que permite medir la concentración de ADN y de su pureza.



Fig. 4 Equipo biofotómetro

Fig. 4 Equipo biofotómetro

3. Calibrar el Biofotómetro ajustando el equipo a cero de absorbancia, utilizando 100 μ L de agua destilada que se colocan en una celda del Biofotómetro. Colocar la celda en el portacelda, presionar el botón “blank” y observar en la pantalla los ceros (Fig. 5).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	222 / 284



Fig. 5 Ajuste del equipo a cero de absorbancia

Fig. 5 Ajuste del equipo a cero de absorbancia

4. Mezclar la muestra y colocar 100 μL en la celda (Fig. 6), insertar la celda en el portacelda y oprimir el botón “Sample”. Anotar los datos que se obtienen en la pantalla: concentración, absorbancia a 230, 260, 280 y el cociente de la relación de las dos absorbancias (260/230, 260/280).



Fig. 6 Pasos a seguir para medir la concentración de una muestra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	223 /284

Resultados

- Registrar las lecturas de las absorbancias de las muestras y de las relaciones 260/230 y 260/280.
- Determinar la concentración utilizando la fórmula escrita en la teoría y teniendo en cuenta la dilución del ADN. Por ejemplo, para un ADN diluido 1/100 en un volumen final de 1 mL y una lectura de 0.050 a 260 nm se tienen que $0.050(\text{DO}) \times 50\mu\text{g/mL} \times 100$ (factor de dilución) = $250\mu\text{g/mL} = 0.25\mu\text{g}/\mu\text{L} = 250\text{ ng}/\mu\text{L}$.
- Verificar la pureza del ADN obtenido comparando los cocientes obtenidos de absorbancias a 260/230 y 260/280 con los teóricos.

Cuestionario

1. ¿Por qué otro método se puede cuantificar la concentración del ADN?
2. ¿Cuál es la importancia de obtener ADN con cociente 260/230 y 260/280 entre 1.7 y 2?
3. ¿Por qué se recomienda medir la absorbancia a 280 nm?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	224 /284

Referencias

1. Concepción J, Puerta B. Prácticas de Biología Molecular. Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana; 2005.
2. Escrig A. Manual de Neurogenética. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A.; 2003.
3. Fonseca D, Mateus H. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica. Bogotá: Universidad del Rosario; 2010.
4. González-Morán MG. Técnicas de Laboratorio en biología celular y molecular. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor S.A.; 2008.
5. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.
6. Mendoza-Rincón JF, García del Valle A, Aguilar-Santelises L. Protocolos en Biología molecular. México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	225 /284

ELECTROFORESIS DE ADN

Objetivos

- ✓ Realizar la electroforesis del ADN extraído, purificado y cuantificado.
- ✓ Analizar las bandas obtenidas en el gel.

Antecedentes académicos

- ✓ Fundamento de la electroforesis
- ✓ Moléculas que se pueden separar por electroforesis
- ✓ Medios de soporte para realizar la electroforesis
- ✓ Modos de disposición del soporte: Horizontal, Vertical
- ✓ Ejemplos de separación electroforética
- ✓ Tinción de proteínas y de ácidos nucleicos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	226 /284

Introducción

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga-energía.

La electroforesis en gel de agarosa es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La agarosa es un polímero lineal, extraído de algas marinas, que al gelificar forma redes en las cuales las moléculas de ADN de doble cadena migran de manera inversamente proporcional al logaritmo en base 10 ($\log_{10}$) de sus tamaños moleculares. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfatos de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo.

Entre los factores que afectan la tasa de migración del ADN en los geles de agarosa se incluyen:

1. El tamaño del fragmento: como ya se mencionó, las moléculas lineales de ADN de doble cadena se desplazan en los geles de agarosa de una manera inversamente proporcional a $\log_{10}$ de sus tamaños moleculares, de modo que a menor tamaño, mayor velocidad de migración.
2. Concentración de Agarosa: Existe una relación lineal entre el logaritmo de la movilidad electroforética del ADN y la concentración del gel: a mayor concentración, menor rango de separación (Cuadro 1).
3. La conformación del ADN: las moléculas circulares y las lineales presentan diferencias en su migración a través de la matriz de agarosa; es así como las formas circulares plegadas migran más rápido que las formas circulares con rompimientos del enlace fosfodiéster en una de las cadenas y que las formas lineales.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	227 /284

Cuadro 1. Eficiencia de separación de ADN de acuerdo a la concentración de agarosa.

Concentración de agarosa en el gel (%)	Eficiencia en el rango de separación de moléculas lineales de ADN (kb)
0.3	5.0-60.0
0.6	1.0-20.0
0.7	0.8-1.0
0.9	0.5-0.7
1.2	0.4-6.0
1.5	0.2-3.0
2.0	0.1-2.0

4. Voltaje aplicado: a voltajes bajos la migración de las moléculas lineales de ADN es proporcional al voltaje aplicado. Sin embargo, si la fuerza iónica del campo es elevada, la movilidad de los fragmentos de alto tamaño molecular se incrementa diferencialmente. Por lo tanto, el rango de separación efectiva en los geles de agarosa decrece cuando se eleva el voltaje aplicado.

5. Amortiguador utilizado: la migración del ADN se ve afectada tanto por la composición como por la fuerza iónica del amortiguador empleado, de manera que se debe establecer un balance de iones que genere una fuerza iónica suficiente para lograr la conductancia eléctrica, sin excederse y ocasionar en el peor de los casos un calentamiento excesivo con fusión de la agarosa y desnaturalización del ADN. Entre los amortiguadores más empleados se encuentran: Tris-acetato-EDTA (TAE), Tris-borato-EDTA (TBE) y Tris-fosfato-EDTA (TPE).

Una vez terminada la electroforesis, la visualización de las moléculas de ADN se logra mediante tinción con bromuro de etidio u otro colorante como el Midori Green®. Esta sustancia se intercala entre las bases del ADN, de manera que el colorante unido al mismo presenta una mayor fluorescencia, que el colorante sólo en solución.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	228 /284

Material y Equipo

- Cámara de electroforesis
- Micropipetas p20, p200 y p1000 μ L
- Puntas nuevas para micropipetas
- Fuente de poder
- Papel cera
- Transiluminador
- Matraz Erlenmeyer de 200 mL
- Probeta de 1000 mL
- Frasco de 1 Litro para TBE

Reactivos

- Amortiguador TBE 10X
- Reactivo Midori green[®]
- Buffer de carga 6X Promega[®]
- Marcador de peso molecular Promega[®]
- Agarosa grado biología molecular



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	229 /284

Método

1. Preparar 1 L de amortiguador TBE 0.5X a partir de TBE 10X.
2. Pesar la cantidad de agarosa requerida según el porcentaje del gel. Por ejemplo, para preparar 100 mL de un gel de agarosa al 0.7% pesar 0.7 g de agarosa y disolverlo en TBE al 0.5X en un matraz Erlenmeyer.
3. Calentar la solución con el fin de disolver por completo la agarosa en el microondas durante aproximadamente un minuto y medio hasta que se observe transparente (Fig. 1).
4. Enfriar un poco y agregar 5 μ L de Midori Green, continuar enfriando y antes que solidifique, servir en el soporte del gel y colocar los peines para formar los pozos en número y tamaño deseados (Figs. 2 y 3).



Fig. 1. Calentamiento de Agarosa

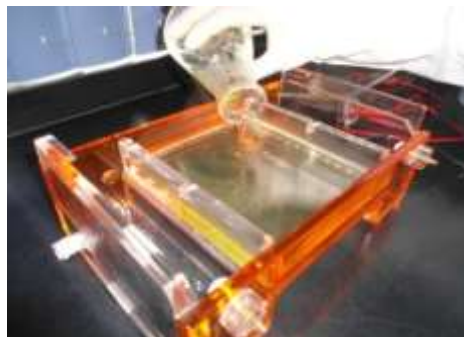


Fig. 2. Llenado del soporte del gel

Fig. 1. Calentamiento de
Agarosa

Fig. 2. Llenado del soporte
del gel



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	230 /284

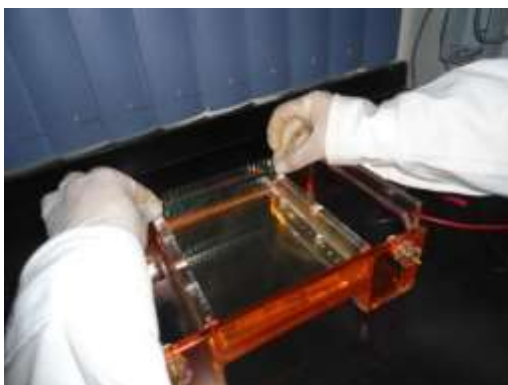


Fig. 3 Colocación del peine

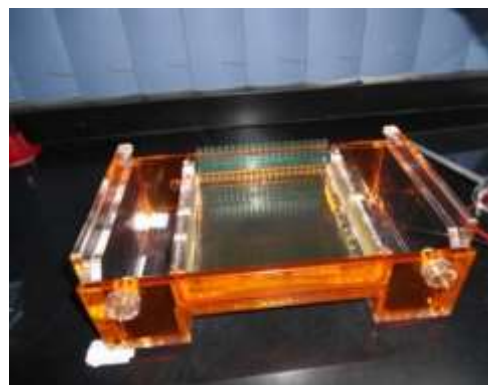


Fig. 4 Gelificación de la agarosa

5. Esperar de 20 a 30 minutos para la gelificación de la agarosa, colocar en la posición correcta la cámara de electroforesis y llenar la misma poco antes del borde máximo marcado con el amortiguador 0.5X (Figs 4, 5 y 6).

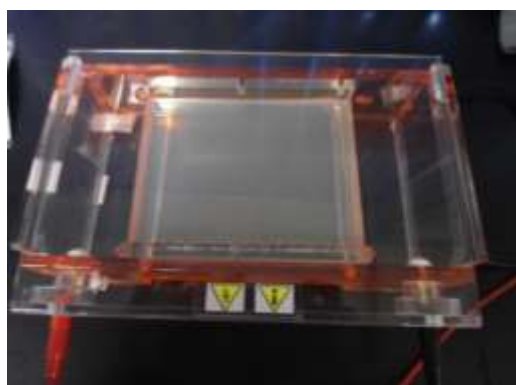


Fig. 5. Colocación de la placa en la
cámara



Fig. 6. Llenado de la cámara

Fig. 6. Llenado de la cámara



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	231 /284

Colocar en el primer pozo 5 μ L del marcador de peso molecular y después las muestras utilizando 4 μ L de cada una, mezclando con 4 μ L de buffer de carga y colocándolas a partir del pozo siguiente en donde se agregó el marcador de peso molecular (Figs. 7 y 8).



Fig. 7. Preparación de muestras

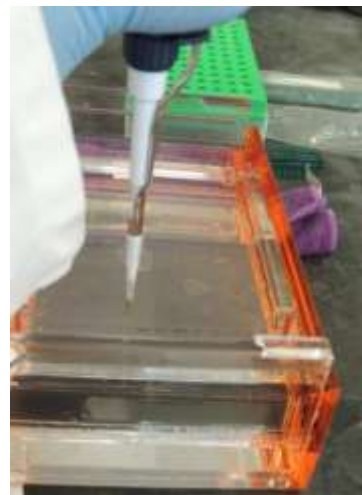


Fig. 8. Colocación de marcador y
muestras en pozos

Fig. 7. Preparación de muestras

6. Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder durante 1 hora 20 minutos (Fig. 9).

Nota: Recordar que el ADN migrará en la cámara de electroforesis del polo negativo hacia el polo positivo



Fig. 9. Conexión
de la cámara a la
fuente de poder.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	232 /284

7. Observar la presencia de las bandas separadas de ADN en el Transiluminador (Fig. 10).

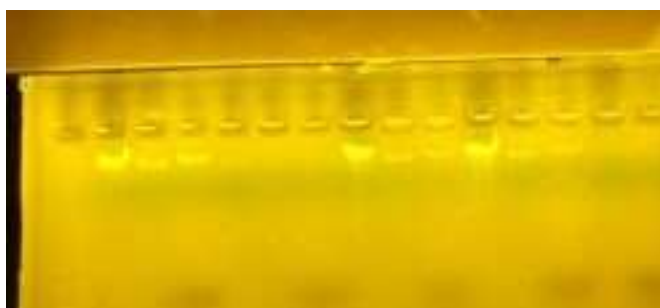


Fig. 10. Observar la presencia de bandas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	233 /284

Resultados

- ✓ Obtener una foto de la electroforesis de las muestras de ADN.
- ✓ Comparar las bandas de cada carril y establecer el peso molecular aparente de cada banda.
- ✓ Realizar un análisis de resultados.

Cuestionario

1. ¿Qué otros polímeros existen para realizar geles para electroforesis?
2. Mencione otros ejemplos de electroforesis.
3. ¿Qué características presentan las moléculas que se pueden separar por medio de la electroforesis?
4. Mencione el fundamento de la tinción con Bromuro de etidio.
5. ¿Qué otros tipos de colorantes se pueden utilizar para teñir geles de agarosa?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	234 /284

Referencias

1. Concepción J. Puerta B. Prácticas de Biología Molecular. Bogotá, Colombia: Editorial pontificia Universidad Javeriana; 2005.
2. Freifelder D. Técnicas de Bioquímica y Biología molecular. Barcelona: Editorial Reverté. 2003.
3. González-Morán MG. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. México: Facultad de ciencias, UNAM, AGT Editor, S.A.; 2008.
4. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Mendoza-Rincón JF, García del Valle A, Aguilar-Santelises L. Protocolos en Biología molecular. México: FES Zaragoza, UNAM; 2004.
7. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	235 /284

EFFECTO DE LA TEMPERATURA Y METALES PESADOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA AMILASA SALIVAL

Objetivos

- ✓ Analizar algunos factores que modifican la velocidad de la reacción que es catalizada por la amilasa
- ✓ Demostrar que la temperatura afecta las reacciones enzimáticas.
- ✓ Determinar la manera en que influye el pH del medio sobre la velocidad de una reacción enzimática y su efecto sobre el carácter iónico de la enzima y del sustrato.
- ✓ Determinar cualitativamente la actividad de la amilasa salival con algunos metales

Antecedentes académicos

- ✓ Concepto de enzima.
- ✓ Métodos para medir la actividad enzimática.
- ✓ Factores que afectan la actividad enzimática.
- ✓ Actividad de la amilasa salival.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA



MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	236 /284



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	237 /284

Introducción

Las enzimas son biocatalizadores (es decir compuestos de origen biológico) que aceleran las reacciones químicas. Las enzimas participan en muchos mecanismos de regulación que de este modo permiten que el metabolismo se adapte a diferentes situaciones. Casi todas las enzimas son proteínas pero también hay ácidos nucleicos catalíticamente activos conocidos como “ribozimas”.

Actualmente se conocen unas 2,000 enzimas y para su clasificación se utiliza un sistema que toma en cuenta tanto la especificidad de acción como la especificidad por el sustrato. Cada enzima está indicada por un número EC de varias cifras en el catálogo de enzimas. El primer número indica que la enzima corresponde a una de las 6 clases principales de enzimas, los dos números siguientes definen la subclase y la sub-subclase y el último número es el número progresivo dentro de la sub-subclase. Por ejemplo en el caso de la deshidrogenasa láctica el número EC correspondiente es 1.1.1.27 (clase 1, oxidorreductasas; subclase 1.1 con el grupo CH-OH como dador de electrones y sub-subclase 1.1.1 NAD (P)+ como aceptor).

En las seis clases principales se incluyen las enzimas que tienen un mecanismo de acción similar:

- Clase 1. Las oxidorreductasas catalizan la transferencia de los equivalentes reductores entre dos sistemas redox.
- Clase 2. Las transferasas catalizan la transferencia de otros grupos de una molécula a otra. Las oxidorreductasas y las transferasas en general requieren coenzimas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	238 /284

- Clase 3. Las hidrolasas transfieren grupos y el aceptor siempre es una molécula de agua.
- Clase 4. Las liasas llamadas con frecuencia “sintasas”, catalizan la ruptura o la formación de uniones químicas, con la formación o la eliminación de dobles enlaces.
- Clase 5. Las isomerasas desplazan grupos dentro de una molécula sin cambiar la fórmula general del sustrato.
- Clase 6. Las ligasas catalizan reacciones en las que se presenta la unión de moléculas dependientes de la energía y por eso siempre están acopladas con la hidrólisis de nucleósidos trifosfatos (habitualmente ATP).

La acción catalítica de una enzima, o sea su actividad, se mide cuantificando el incremento de la velocidad de la reacción en condiciones perfectamente definidas, es decir midiendo la diferencia del recambio entre la reacción catalizada y la reacción no catalizada en un tiempo determinado. Normalmente las velocidades de reacción se expresan como cambios de concentración por unidad de tiempo ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Como la actividad catalítica es independiente del volumen, la actividad enzimática se expresa indicando el recambio por unidad de tiempo con la unidad llamada **katal** (kat, $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$). Otra unidad usual es la **unidad internacional UI** (μmol de recambio $\cdot \text{min}^{-1}$, cuya equivalencia es $1\text{UI} = 16.7 \text{ nkat}$).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	239 /284

La acción de la amilasa salival sobre el almidón constituye el primer paso de la digestión de estos polisacáridos en su paso por el tubo digestivo (Fig.1). Aunque su papel en la digestión es escaso ya que el contacto de la enzima con su sustrato es de corta duración, puesto que el pH gástrico inhibe su actividad.

Cuando se incuba saliva con almidón y se toman muestras a diferentes tiempos, a las que se les agrega yodo, el ensayo de color, inicialmente azul, cambia sucesivamente a púrpura, marrón rojizo y, finalmente desaparece el color a medida que la amilasa hidroliza las moléculas de almidón.

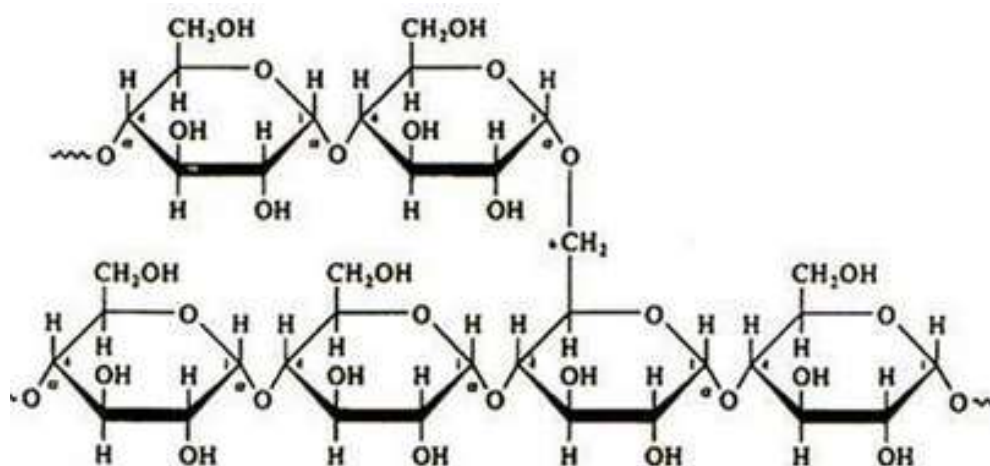


Fig. 1. Estructura de la amilopectina. Susceptible a la acción de la amilasa en los enlaces alfa (1-4).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	240 /284

Material y Equipo

- Vasos de precipitados de 50 mL
- Parrilla de agitación y calentamiento
- Pipetas graduadas de 1 y 2 mL
- Tubos de ensaye de 13 X 100
- Gradilla
- Termómetro

Reactivos

- Solución de almidón al 0.8% en solución salina
- Solución salina al 0.85%
- Lugol
- Soluciones de metales: CuSO_4 al 1%, HgSO_4 al 1%, PbOAc al 1%, AgNO_3 al 1%



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	241 /284

Método

- **Determinación de actividad.**

1. Preparar 10 tubos o más con 2 mL de solución salina y 1 o 2 gotas de lugol (fig. 2).

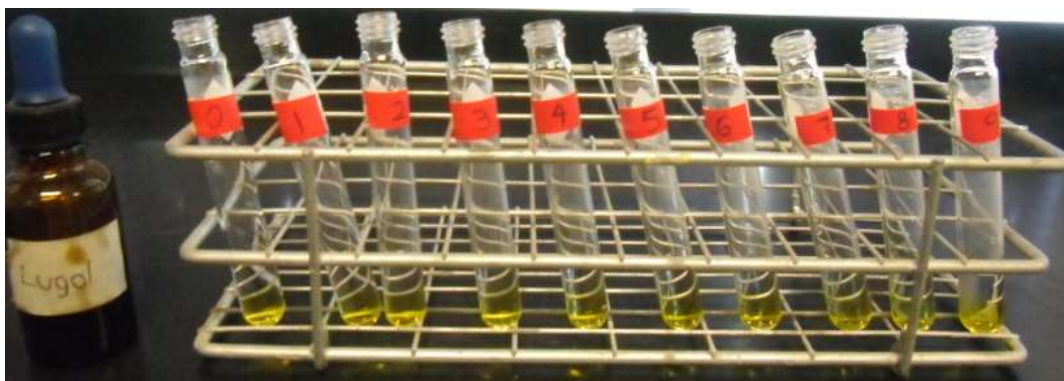


Fig.2. Tubos con solución salina y lugol.

2. Colocar 6 mL de almidón al 0.8% en baño María a 37°C y añadir 0.8 mL de saliva filtrada y diluida 1:10 con solución salina (a la misma temperatura), mezclar rápidamente y mantener a la misma temperatura.
3. En el momento que se mezcla la saliva con el almidón se toma una alícuota de 0.5 mL, se coloca en uno de los tubos ya preparados, etiquetándolo como tiempo cero, se continúa tomando alícuotas de 0.5 mL a intervalos de 30 segundos, colocándolas en los tubos preparados con solución salina y lugol, observando el color de la reacción hasta llegar al punto acrómico (significa que la solución mantenga el mismo color que tenía originalmente).
4. Guardar el último tubo (punto acrómico), para compararlo con los experimentos posteriores.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	242 / 284

- **Influencia de los metales pesados sobre la actividad.**

- 1 Preparar 4 tubos con 6 mL de almidón al 0.8%, que previamente se incubó a 37°C, adicionar al:

Tubo 1. 2 gotas de CuSO_4 al 1%.

Tubo 2. 2 gotas de HgSO_4 al 1%.

Tubo 3. 2 gotas de PbOAc al 1%.

Tubo 4. 2 gotas de AgNO_3 al 1%.

- 2 Agregar a cada tubo 0.8 mL de saliva filtrada y diluida; agite vigorosamente para homogenizar y dejar transcurrir el tiempo que se haya necesitado para llegar al punto acrómico en el primer experimento.
- 3 Al cabo de este tiempo tomar de cada tubo una alícuota de 0.5 mL y colocarlas en tubos que contengan 2 mL de solución salina y 2 gotas de lugol. Anotar los resultados.

- **Efecto de la temperatura.**

- 1 Colocar 6 tubos (uno a cada temperatura) en baño de agua a 0°, 20°, 37°, 50°, 70° y 90°C; cada tubo contendrá 6 mL de solución de almidón y se mantendrán a esa temperatura por 15 minutos.
- 2 Al mismo tiempo se colocan en la misma forma (incubados a la respectiva temperatura) otros 6 tubos, que contengan 0.8 mL de saliva (filtrada y diluida).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	243 /284

- 3 Una vez que ambos grupos de tubos se encuentran a su correspondiente temperatura, se mezclan las 2 soluciones y se mantienen a la misma temperatura por el tiempo acrómico obtenido en el primer experimento.
- 4 Al término de este tiempo se toman de cada tubo una alícuota de 0.5 mL y se colocan en tubos que contengan 2 mL de solución salina y 2 gotas de lugol. Anotar los resultados.

- **Propuesta de otro experimento que afecte la actividad de la amilasa.**

En la siguiente sesión de laboratorio, los alumnos realizan una propuesta para observar otro parámetro que afecte la actividad de la amilasa salival, tomando como base el diseño de los experimentos anteriores.

Resultados

- Reportar el tiempo obtenido para el punto acrómico.
- Interpretar el color obtenido y su intensidad con respecto a la actividad de la amilasa (velocidad de reacción).
- Para el efecto de los metales sobre la actividad enzimática, reportar el color obtenido y la intensidad del efecto sobre la actividad de la amilasa (indique el grado de inhibición con cruces) y analice los resultados de cada caso.
- Para el efecto de temperatura, reportar el color obtenido y utilizar el grado de intensidad como sinónimo de velocidad de reacción para graficarla contra temperatura.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	244 /284

Cuestionario

1. ¿Cuál es el efecto de la temperatura sobre las enzimas?
2. ¿De qué manera interfieren los metales sobre la actividad enzimática?
3. ¿Qué es la constante de Michaelis-Menten? ¿Cómo se obtiene gráficamente y qué indica?
4. ¿Cómo se modifican los valores de K_m para los distintos tipos de inhibidores?

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza; 2007.
2. Aguilar L., Escalante R. Manual de prácticas de Bioquímica Celular y de los Tejidos 1. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2008.
3. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
4. Koolman J., Röhm K. Bioquímica: texto y atlas. 3º ed. Madrid: Medica Panamericana, 2004.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Plumer DT. Introducción a la Bioquímica práctica. Barcelona: Mac Graw-Hill; 1987.
7. Rendina G. Técnicas de Bioquímica aplicada. México: Interamericana; 1979.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	245 / 284

CINÉTICA ENZIMÁTICA DE LA INVERTASA

Objetivos

- ✓ Analizar algunos factores que modifican la velocidad de la reacción que es catalizada por la invertasa.
- ✓ Demostrar la relación lineal entre la velocidad de reacción y la concentración de la enzima presente.
- ✓ Determinar cómo influye el pH del medio sobre la velocidad de una reacción enzimática y su efecto sobre el carácter iónico de la enzima y del sustrato.
- ✓ Demostrar que la temperatura afecta las reacciones enzimáticas.
- ✓ Observar el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática y determinar K_m , $V_{máx}$, por los métodos conocidos.

Antecedentes académicos

- ✓ Características de las enzimas
- ✓ Cinética enzimática.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	246 /284

Introducción

Las enzimas en su mayoría son proteínas que catalizan reacciones químicas en los seres vivos, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No hacen factibles las reacciones imposibles, sino que solamente aceleran las que espontáneamente podrían producirse, debido a que como catalizadores no pueden acelerar reacciones termodinámicamente desfavorecidas. Las enzimas hacen posible que en condiciones fisiológicas normales, tengan lugar reacciones que sin catalizador, requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH.

Aspectos generales sobre las enzimas. Prácticamente todas las reacciones químicas que tienen lugar en los seres vivos están catalizadas por enzimas. Las enzimas son catalizadores específicos: cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos.

Propiedades de las Enzimas. Las propiedades de las enzimas de origen proteico derivan del hecho de ser proteínas y de actuar como catalizadores. Como proteínas, poseen una conformación natural más estable que las demás conformaciones posibles. Por lo tanto, cambios en la conformación suelen ir asociados a cambios en la actividad catalítica. Los factores que influyen de manera más directa sobre la actividad de un enzima son:

- pH
- Temperatura
- Cofactores
- Concentración de sustrato



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	247 / 284

Efecto del pH sobre la actividad enzimática. Las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos $-\text{COOH}$; amino $-\text{NH}_2$; tiol $-\text{SH}$; imidazol; etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos. Según el pH del medio, estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. Este es el llamado pH óptimo.

Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10°C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura empiezan a desnaturalizarse por el calor. La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Temperaturas más altas que la óptima producen desnaturalización térmica de la proteína y la actividad enzimática decrece rápidamente hasta anularse.

Efecto de los Cofactores Sobre la Actividad Enzimática. Casi un tercio de las enzimas, requieren para su función sustancias no proteicas, llamadas cofactores, los cuales pueden ser iones inorgánicos como Fe^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , etc. Cuando dichos cofactores son moléculas orgánicas, se llaman coenzimas, que se sintetizan a partir de vitaminas. Cuando los cofactores y las coenzimas se encuentran unidos covalentemente a la enzima se llaman grupos prostéticos y dan lugar a la forma activa de la enzima conocida como holoenzima, asimismo, se conoce como apoenzima a la parte proteica inactiva de una enzima.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	248 /284

Cinética Enzimática. La cinética enzimática estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas. Estos estudios proporcionan información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad del enzima. La velocidad de una reacción catalizada por un enzima puede medirse con relativa facilidad, ya que en muchos casos no es necesario purificar o aislar el enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH, temperatura, presencia de cofactores, etc, y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima ($V_{\max}$). La velocidad de reacción puede determinarse bien midiendo la aparición de los productos o la desaparición de los reactivos en unidades de concentración por unidad de tiempo.

Para estudiar la cinética enzimática se mide el efecto de la concentración inicial de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción, manteniendo la cantidad de enzima constante. Si representamos V_0 frente a $[S]_0$ obtenemos una gráfica como la de la Figura 1. Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. A altas $[S]_0$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima ($V_{\max}$).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	249 /284

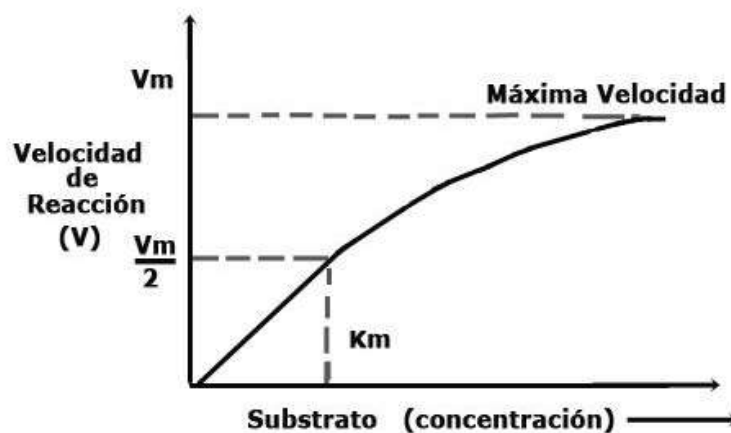


Fig. 1. Gráfica de cinética enzimática.

Para determinar gráficamente los valores de K_M y V_{max} es más sencillo utilizar la representación doble recíproca ($1/v_0$ frente a $1/[S]_0$), ya que es una línea recta. Esta representación doble recíproca recibe el nombre de representación de Lineweaver-Burk, (Fig. 2).

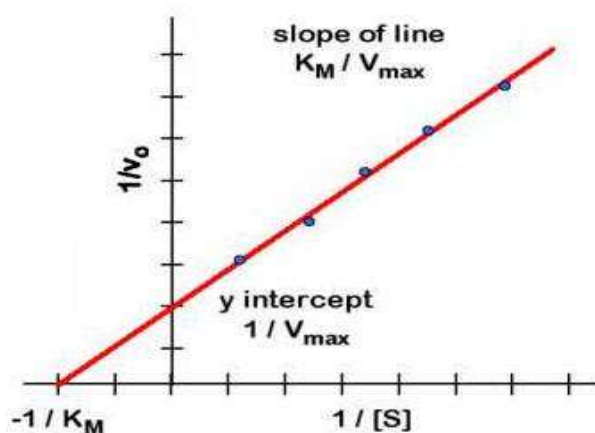


Fig. 2. Gráfica Lineweaver-Burk



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	250 /284

Material y Equipo

- Pipetas de 0.2, 1 y 5 mL
- Micropipetas p200, p1000 y p5000 µL
- Tubos de ensaye 13 X 100 mm, (mínimo 20 por equipo)
- Gradilla
- Vasos de precipitados de 100 y 250 mL
- Baño de hielo
- Termómetro
- Matraces volumétricos de 50, 100 y 250 mL
- Celdas para espectrofotómetro
- Marcador indeleble de punta extrafina
- Baño María
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro

Reactivos

- Sacarosa 0.35 M
- Glucosa 0.005 M - Fructosa 0.005 M
- Regulador de Acetatos 0.05 M pH 4.7
 - Ácido acético
 - Acetato de sodio
- Reactivo de 3,5 dinitrosalicílico
 - Hidróxido de sodio
 - Tartrato de sodio y potasio
 - Fenol
 - Ácido 3,5-dinitrosalicílico
 - Metasulfito de sodio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	251 /284

- Enzima invertasa 10 μg / mL (653 U.I.)
- Regulador de citratos 0.2 M-EDTA 0.01 M
 - o Citrato de sodio
 - o Ácido cítrico
- EDTA (sal disódica) 0.01 M

Preparación de reactivos

- 1) Sacarosa 0.35 M.
 - o Disolver 119.56 g de sacarosa y llevar a 1 L con agua destilada.
- 2) Regulador de acetatos 0.05 M pH 4.7.
 - o Mezclar 1 L de ácido acético 0.05M (2.88 mL de ácido acético glacial en 1 L de agua destilada), con 1 L de acetato de sodio 0.05M (6.8 g de acetato de sodio en 1 L de agua destilada), verificar el pH y ajustar si es necesario.
- 3) Reactivo de 3,5-dinitrosalicílico.
 - o Pesar: NaOH 14.0 g, ácido 3,5 dinitrosalicílico 7.50 g, Tartrato de sodio y potasio 216.0 g, Fenol 5.6 g, Metasulfito de sodio 5.9 g. Es importante agregar los reactivos en agua destilada en el orden señalado, no se debe añadir el siguiente sino hasta que se haya disuelto por completo el anterior, finalmente completar a 1 L.
Se debe dejar reposar en frasco ámbar el reactivo por espacio de por lo menos 24H antes de utilizarse.
El reactivo se puede conservar en mejores condiciones en refrigeración.
- 4) Glucosa 0.005M-Fructosa 0.005M.
 - o Pesar 0.9 g de glucosa y 0.9 g de fructosa, mezclarlas y llevar a 1 L con agua destilada.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	252 /284

5) Solución de invertasa 10 μ g (653 U.I).

- Pesar 1 mg de invertasa y disolver en 100 mL de regulador de acetatos 0.05 M pH 4.7.

6) EDTA (Sal disódica) 0.01 M.

- Pesar 3.72 g de EDTA y llevar a 1 L con agua destilada.

7) Regulador de citratos 0.2M-EDTA 0.01 M.

- Pesar 5.88 g de citrato de sodio y llevar a 100 mL con una solución de EDTA 0.01 M. Pesar 4.2 g de ácido cítrico y llevar a 100 mL con una solución de EDTA 0.01 M.

Mezclar estas dos soluciones para obtener los reguladores de pH 2.5, 3.5, 4.5, 5.0, 5.5, 6.5 y 7.5 (adicionar NaOH para ajustar el PH).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	258 / 284

Resultados

- Elaborar la curva estándar, con las lecturas de absorbancia y concentración de azúcares reductores.
- Con ayuda de la curva estándar, obtener la concentración de azúcares reductores en μmol .
- Calcular la velocidad considerando que el tiempo de reacción fue de 5 min.
- Realizar las gráficas:
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs concentración de enzima [E] en μg .
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs pH
 - Velocidad en $\mu\text{mol}/\text{min}$ vs temperatura en $^{\circ}\text{C}$
 - Velocidad en mol/min vs concentración de sustrato [S] en mol
- Realizar las siguientes determinaciones:
 - pH y temperatura óptima de la enzima
 - K_m y $V_{\text{máx}}$ por el procedimiento gráfico de Lineweaver-Burk.

Cuestionario

1. ¿Qué es una Enzima?
2. ¿Cómo afecta temperatura y pH extremos la actividad enzimática?
3. Describa el significado de K_m y $V_{\text{máx}}$ y ¿cómo se obtienen de forma gráfica?
4. ¿Qué significado tiene una unidad estándar de actividad enzimática?
5. Mencione 5 enzimas utilizadas en la industria, y en qué procesos participan.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	259 /284

Referencias

1. Clark J. Bioquímica experimental. México: Ed. Limusa; 1966.
2. García-del Valle A, Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT. Protocolos de Bioquímica Celular y de los Tejidos I (complemento). México: FES Zaragoza, UNAM; 2004
3. Karp G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. 6ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011.
4. Harper HA, et al. Bioquímica de Harper. 28ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4ª ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Plumer DT. Introducción a la bioquímica práctica. Ed. Mac Graw-Hill; 1987.
7. Tena AM, Jorrín NJV. Estudio cinético de la actividad invertasa de levadura de panadería. Córdoba 2011 [on line] disponible en: <http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/32%20INVERTASA%20CIN%C3%89TICA.pdf>.
8. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	260 /284

MITOSIS

Objetivos

- ✓ Identificar los principales cambios morfológicos que se presentan durante la profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis en células de raíces de cebolla.
- ✓ Realizar las preparaciones de raíces de cebolla.
- ✓ Observar en el microscopio las diferentes fases de la mitosis en raíces de cebolla.
- ✓ Evaluar la importancia de la división celular en el desarrollo, el crecimiento y la reposición de células en tejidos dañados o deteriorados.

Antecedentes académicos

- ✓ Estructura celular
- ✓ Ciclo celular
- ✓ Etapas de la mitosis
- ✓ Características estructurales y funcionales de los cromosomas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	261 /284

Introducción

Todos los seres vivos uni-pluricelulares tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones. Al reproducirse, las células de los diferentes organismos tendrán que asegurar que todo el material se reparta en forma aproximadamente equitativa entre las células hijas resultantes. No obstante, existe una molécula que tendrá que ser duplicada exactamente, el ácido desoxirribonucleico o ADN, la molécula encargada de definir a los diferentes organismos y la responsable de la herencia. Los acontecimientos que ocurren durante la reproducción celular están comprendidos dentro del proceso conocido como ciclo celular, el cual está determinado por cinco fases diferentes, las que aseguran que el ADN se duplique, fase S (síntesis), se reparta exactamente entre dos núcleos, o fase M (mitosis), y que dichos núcleos posteriormente formen parte de dos células diferentes al repartirse el material celular y dividirse a célula madre, o citocinesis.

Las dos fases restantes, llamadas G1, G2 anteceden a las fases de síntesis y de mitosis, respectivamente, y son fases donde ocurren múltiples procesos regulatorios propios del ciclo celular.

La mitosis es un proceso de división nuclear en el que las moléculas replicadas de ADN de cada cromosoma se reparten con exactitud en dos núcleos. La mitosis suele acompañarse de la citocinesis, un proceso por el que una célula en división se separa en dos, con lo que el citoplasma se divide en dos paquetes celulares. Las dos células hijas resultantes de la mitosis y la citocinesis tienen un contenido genético idéntico entre sí al de la célula madre de la que provienen. Por tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para el crecimiento y el mantenimiento de un organismo. La mitosis puede ocurrir en células haploides o diploides. Las células mitóticas haploides se encuentran en hongos, gametofitos de las plantas, y en unos cuantos animales. La mitosis es



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	262 /284

una etapa del ciclo celular en la que la célula dedica toda su energía a una sola actividad: la separación cromosómica. Como resultado la mayor parte de las actividades metabólicas de la célula, entre ellas la transcripción y la traducción se detienen durante la mitosis y la célula entra en una falta relativa de respuesta a los estímulos externos.

- **La mitosis se divide en cinco etapas:**

PROFASE. En la profase la envoltura nuclear permanece intacta mientras que la cromatina duplicada durante la fase S se condensa en estructuras cromosómicas definidas llamadas cromátidas. Los cromosomas de las células mitóticas contienen dos cromátidas conectadas entre sí por el centrómero. Se forman complejos proteínicos especializados, llamados cinetocoros y se asocian a cada cromatina. Los microtúbulos del huso mitótico se conectarán a cada cinetocoro a medida que los cromosomas se empiezan a separar más tarde en la mitosis. Los microtúbulos del citoplasma se desensamblan y luego se reorganizan sobre la superficie del núcleo para formar el huso mitótico. Dos parejas de centriolos se alejan mutuamente al crecer los haces de microtúbulos que forman el huso mitótico. El nucléolo, el orgánulo dentro del núcleo en el que sintetizan los ribosomas, desaparecen en la profase.

PROMETAFASE. La desaparición de la envoltura nuclear marca el comienzo de la prometafase. Los microtúbulos del huso se unen a los cinetocoros y empujan a los cromosomas a lo largo del huso.

METAFASE. La metafase se caracteriza porque las cromátidas están alineadas en el ecuador del huso, a medio camino entre los dos polos. Las cromátidas alineadas forman la placa de la metafase. Las células se pueden detener en la metafase cuando se utilizan inhibidores de los microtúbulos. Los análisis del cariotipo utilizados para determinar la composición y la estructura global del cromosoma, suelen requerir que las células estén en metafase.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	263 /284

ANAFASE. En la anafase, los polos mitóticos se siguen separando como resultado del alargamiento de los microtúbulos polares. Cada centrómero se divide en dos y también se separan las parejas de cinetocoros. Las cromátidas hermanas migran hacia los polos opuestos del huso.

TELOFASE. La telofase es la última fase de la división nuclear, que se caracteriza por la desaparición de los microtúbulos del cinetocoro y la disociación del huso mitótico. Se forman las envolturas nucleares alrededor de los dos núcleos que contienen las cromátidas, que se descondensan en cromatina dispersa, y los nucléolos se vuelven a formar en los núcleos de las células hijas.

- **Observación de células en mitosis en raíz de cebolla**

La raíz de la cebolla es utilizada en experimentos de laboratorio para ver cómo ocurre la división celular en plantas. La raíz de cebolla es elegida por lo general debido a que sus cromosomas son más grandes que en la mayoría de otras plantas y se tiñen de oscuro, haciéndolos más fáciles de ver bajo el microscopio. Es un tejido excelente y fácil de obtener para esta práctica es el tejido que prolifera en las puntas de raíz del *Allium cepa* (cebolla), donde pueden localizarse muchas células en mitosis.

Para obtener las preparaciones adecuadas es preciso disponer de cebollas frescas y colocarlas en frascos de boca amplia, de manera que la zona de las raíces esté en contacto con el agua de los frascos. En este punto es necesario advertir que deben utilizarse cebollas que no hayan sido sometidas a procesos de irradiación o químicos para evitar que germinen.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	264 / 284

Material y Equipo

- Microscopio Óptico
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Bisturí
- Pinzas punta de roma
- Vidrio de reloj
- Varilla de vidrio con gendarme
- Papel filtro
- Papel seda

Reactivos

- Solución colorante de acetorceína y/o acetocarmín.
- Líquido de Carnoy (10 mL de ácido acético glacial, 30 mL de cloroformo, 60 mL de etanol absoluto).
- Solución etanol-HCl (mezcla 1:1 V/V etanol 96% y HCl concentrado).

Material Biológico

- Raicillas de cebolla fijadas en etanol al 70%, puestas a germinar una semana antes de realizar la práctica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	265 /284

Método

1. Promover el crecimiento de las raíces de cebolla. La cebolla deberá colocarse en agua para promover el crecimiento de las raicillas (Fig. 1).

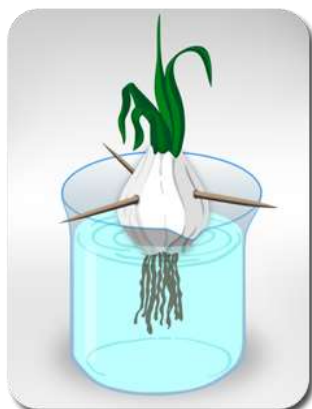


Fig. 1 Dibujo de la forma en que se coloca la cebolla para el crecimiento de las raíces.

2. Trabajar con raicillas que se hayan cortado y fijado con anterioridad en etanol al 70% durante 12 y 24 horas (Fig. 2), utilizando pinzas de disección.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	266 /284



Fig. 2 Raíces de cebolla cortadas y fijadas en etanol al 70%

3. Utilizar pinzas de disección, escoger algunas de las raicillas (manipular las raicillas por donde se hayan cortado y no por la punta o meristemo) y transferirlas a un vidrio de reloj que contiene 1 mL de solución etanol-HCl y dejarlas durante 5 minutos en la solución (Fig. 3). Este tratamiento destruye el cemento que mantiene unida a todas las células.



Fig. 3 Raíces de cebolla con solución de etanol-HCl

4. Cortar las raicillas aproximadamente de un largo de 3 mm y transferirlas a otro vidrio de reloj que contiene líquido de Carnoy (el reactivo de Carnoy es venenoso y flamable), dejarlas en este líquido durante 3 minutos (Fig. 4). Este



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	267 / 284

tratamiento endurece el material, el cual ya está ablandado con la solución de etanol-HCl y que reduce cualquier daño a las células en los siguientes procedimientos.



Fig. 4 Raíces de cebolla con líquido de Carnoy

5. Nuevamente transferir las raicillas al centro de un portaobjetos limpio. Utilizando un bisturí o navaja de rasurar cortar la punta o meristemo de las raicillas (últimos 2 mm) y desechar el resto. Inmediatamente añadir 1 a 2 gotas de la solución colorante de acetorceína o acetocarmín (Fig. 5).



Fig. 5 Colorante acetocarmín agregado a las raíces de cebolla



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	268 /284

6. Cortar la punta en pedazos pequeños en forma de maceración (Figs. 6 y 7) y dejar en solución durante 5 minutos. No dejar que la preparación se seque; si esto sucede añadir más colorante.



Fig. 6 Corte de las raíces de cebolla
con bisturí

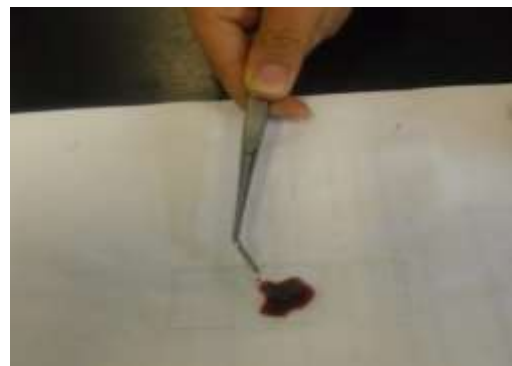


Fig. 7 Maceración de las raicillas

7. Después colocar un cubreobjetos limpio sobre la muestra y con la goma de un lápiz en forma vertical presionar ligeramente (Fig. 8), para dispersar las células unas con otras, enseguida realice un squash (Fig. 9) que consiste en colocar la preparación con el cubreobjetos hacia abajo sobre un papel filtro y con los pulgares de las manos apoyando el peso del cuerpo ejercer una fuerte presión evitando que la preparación se desplace. Si quedan burbujas de aire en la preparación, elimínelas poniendo al borde del cubreobjetos una gota de colorante.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	269 /284



Fig. 8 Imagen de la forma en que se debe colocar el portaobjetos encima de la muestra



Fig. 9 Squash de la preparación

8. Hacer las observaciones e identifique las fases de la MITOSIS, al microscopio utilizando los objetivos; 10X, 40X, y 100X (Fig. 10)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	270 /284

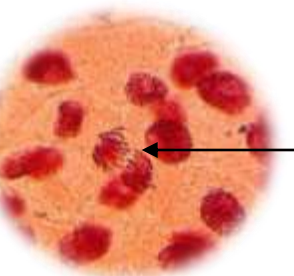
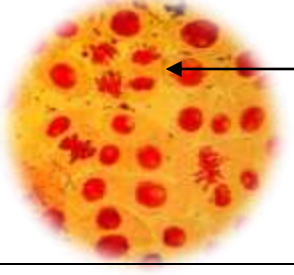
	Profase
	Metafase
	Anafase
	Telofase

Fig. 10. Fases de la mitosis en raíces de cebolla



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	271 /284

Resultados

- Realizar los esquemas, dibujos y tomar fotografías de las observaciones vistas al microscopio, indicando el aumento en el que se observaron y describiendo las estructuras identificadas, así como la etapa de la mitosis a la que corresponde.

Cuestionario

1. ¿Cuál es la importancia de la mitosis?
2. ¿Cuáles son las etapas de la mitosis?
3. ¿Cuáles son las estructuras celulares que se distinguen durante la mitosis?
4. ¿Qué es el meristemo?
5. ¿Cuál es la función del huso mitótico?
6. ¿Qué es la meiosis? ¿Qué diferencias presenta con respecto a la mitosis?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	272 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza, UNAM; 2007.
2. Chandar N. Biología molecular y celular. México: Wolters Kluwer Health; 2010.
3. Jiménez F, García M. Biología celular y molecular. México: Pearson; 2003.
4. Karp G. Biología celular y molecular (conceptos y experimentos). 6ª ed. México: Mc Graw Hill; 2011.
5. Lincoln T. Fisiología vegetal. 3ª ed. USA: Publicaciones de las Universitat Jaume; 2006.
6. Stephen R. Bolsover J. Biología celular. España: Acribia; 2008.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	273 /284

FOTOSÍNTESIS

Objetivos

- ✓ Analizar el proceso fotosintético.
- ✓ Aplicar el fundamento de la cromatografía en papel para determinar los pigmentos fotosintéticos que se encuentran presentes en las plantas.
- ✓ Identificar los pigmentos fotosintéticos a partir de un barrido en el espectrofotómetro.
- ✓ Observar la diferencia de pigmentos que se encuentran en una planta verde y una roja a partir de su cromatografía en papel.

Antecedentes académicos

- ✓ Reacciones del proceso de la Fotosíntesis.
- ✓ Pigmentos fotosintéticos.
- ✓ Espectro de absorción de pigmentos fotosintéticos.
- ✓ Cromatografía en papel.



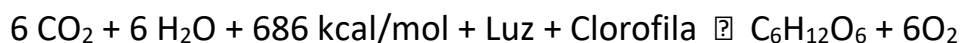
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	274 /284

Introducción

En una planta más del 90% de su peso seco está constituido por las diferentes sustancias y moléculas orgánicas que forman sus estructuras celulares o que regulan su metabolismo. Las cadenas carbonadas iniciales que emplean todas las células las proporciona la fotosíntesis.

La vida en la Tierra continúa dependiendo de la fotosíntesis. Los organismos fotosintéticos capturan la energía de la luz y, en una serie de reacciones muy compleja, la utilizan para fabricar glucósidos, y liberar el oxígeno, a partir del dióxido de carbono y del agua.

La fotosíntesis es en esencia un proceso de óxido-reducción, en el que el carbono del dióxido de carbono (CO_2) se reduce a carbono orgánico. Aunque en algunos microorganismos fotosintéticos el proceso es diferente, la fotosíntesis en las plantas consiste básicamente en la producción de una sustancia orgánica (un glúcido sencillo) a partir de moléculas inorgánicas (el dióxido de carbono como sustrato a reducir, y el agua como dador de electrones que se oxida) mediante el aprovechamiento de la energía lumínica (que queda almacenada como energía química dentro de la molécula sintetizada) y con desprendimiento de oxígeno. El proceso global puede expresarse mediante la siguiente reacción:



Para que la energía de la luz pueda ser usada por los seres vivos, primero ha de ser absorbida. Una sustancia que absorbe la luz se denomina pigmento. Algunos pigmentos absorben la luz en todas las longitudes de onda y por lo tanto tienen un color negro. Otros exclusivamente absorben a ciertas longitudes de onda y reflejan o transmiten las longitudes de onda que no



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	275 /284

absorben. Por ejemplo la clorofila, el pigmento que hace que las hojas sean verdes, absorbe la luz en el espectro violeta y azul y también el rojo. Puesto que transmite y refleja la luz verde, su aspecto es verde (Fig. 2).

Los diversos grupos de organismos fotosintéticos usan varios tipos de pigmentos en la fotosíntesis. Existen varias clases de clorofilas, que varían ligeramente en su estructura molecular. La molécula de clorofila está formada por un anillo de porfirina con un átomo de magnesio en su centro, y asociado a este una cadena de fitol (alcohol de cadena larga) (Fig.1).

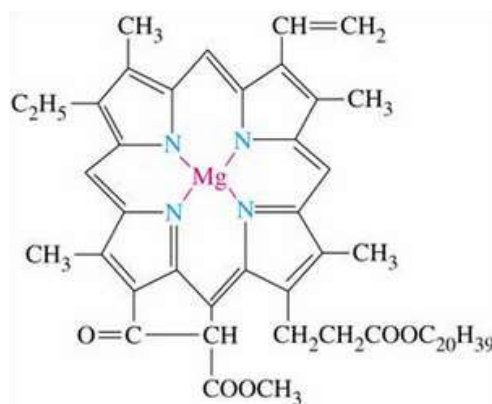


Fig. 1. Estructura de la clorofila.

La relación entre la fotosíntesis y la presencia de estos pigmentos queda claramente de manifiesto cuando se compara el espectro de acción de la fotosíntesis (eficiencia fotosintética frente a longitud de onda) con los espectros de absorción de las clorofilas.

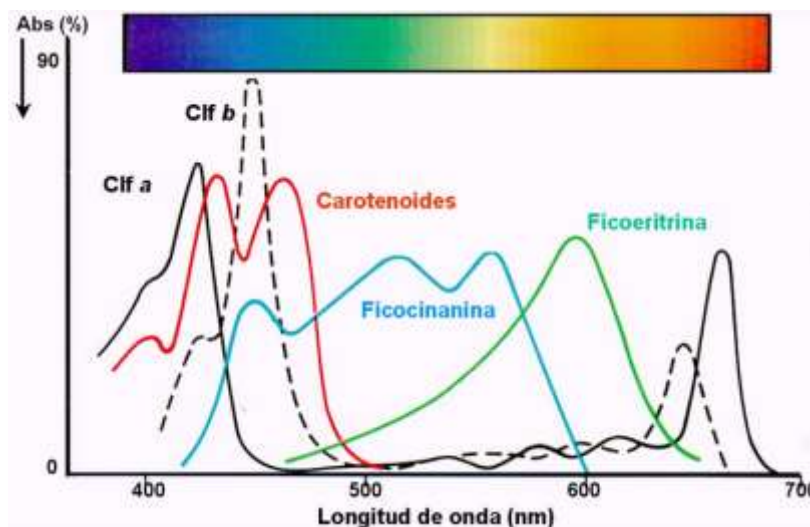
Cuando un pigmento absorbe luz, los electrones de las moléculas son lanzados a niveles energéticos superiores. En la mayoría de los casos, los electrones vuelven a su estado inicial casi de inmediato. La energía desprendida cuando regresan al nivel energético puede (1) emitirse de nuevo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	276 /284

en una longitud de onda superior, fenómeno que se conoce como fluorescencia, (2) disiparse en forma de calor (conversión interna), o (3) ser absorbida por una molécula vecina, que lanza sus electrones a niveles de energía superiores (transferencia de extinción por resonancia inductiva).

Fig. 2. Espectro de absorción de las clorofilas a y b. El eje horizontal muestra la longitud de onda desde 400 nm (luz azul) hasta 700 (luz roja).



Material y Equipo

- Mortero con pistilo
- Embudo de tallo largo
- Hojas de plantas verdes y rojas
- Espectrofotómetro.
- Papel filtro de poro abierto.
- Celdas
- Soporte universal



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	277 / 284

- Anillo de hierro.
- Vasos de precipitados de 150 y 250 mL

Reactivo

- Alcohol 96⁰

Método

1. Lavar las hojas cuidadosamente utilizando únicamente agua hasta quitar cualquier excedente de tierra (Fig. 3).



Fig. 3. Hoja sin excedente de tierra.

2. Cortar las hojas en trozos pequeños (sin enervaciones) y triturarlas en un mortero, adicionando etanol constantemente para facilitar la extracción de los pigmentos, hasta que el líquido adquiera una coloración similar a la de la hoja.
3. Filtrar el macerado con ayuda de un embudo de tallo largo y papel filtro de poro abierto. Recolectar el filtrado en un vaso de precipitados de 150 mL.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	278 /284

4. Colectar 5 mL del filtrado en un tubo de ensayo y guardarlo para la prueba espectrofotométrica.

Cromatografía en papel.

1. Recortar una tira de papel filtro de poro abierto de 20 cm x 7 cm e introducirla en el vaso que contiene el filtrado como lo ilustra la figura 4. Esperar a que eluya la mezcla de pigmentos y se formen las bandas de los diferentes pigmentos eluidos.



Fig. 4. Elución de pigmentos fotosintéticos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	279 /284

2. Realizar el procedimiento anterior utilizando hojas rojas o incluso mezclando hojas verdes y rojas (Figs. 5, 6 y 7).



Fig. 5. Cromatografía en papel de
mezcla de hojas verdes y rojas.



Fig. 6.
Cromatografía
en papel de
pigmentos de
hoja roja.



Fig. 7.
Cromatografía
en papel de
pigmentos de
hojas verdes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	280 /284

- **Análisis espectrofotométrico.**

1. Realizar una dilución 1:30 del extracto con etanol.
2. Pasar la muestra a una celda (Fig. 8) y hacer un barrido en el espectrofotómetro registrando las absorbancias cada 10 nm desde los 400 hasta los 750 nm. El blanco de ajuste será etanol al 96%.

Nota: Recordar ajustar a 0 de absorbancia cada que se cambie la longitud de onda.



Fig. 8. Muestra y
blanco de ajuste.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	281 /284

Resultados

- Identifique los pigmentos obtenidos durante la cromatografía en papel.
- Realice la gráfica de absorbancia contra longitud de onda (espectro de absorción) del pigmento extraído.
- Analice y fundamente los resultados obtenidos en el espectro de absorción experimental, con respecto al espectro teórico de los diferentes pigmentos fotosintéticos.

Cuestionario

1. ¿Qué es la fotosíntesis? Describa el proceso de manera general.
2. ¿Cuál es la importancia de los pigmentos fotosintéticos?
3. ¿En cuanto a los pigmentos, ¿Cuál es la diferencia entre una hoja verde y una hoja roja?
4. ¿Por qué se utiliza etanol en la extracción?
5. ¿Cuál es la diferencia entre los diferentes tipos de clorofila además de su estructura?
6. ¿Qué ventajas presenta el utilizar la cromatografía en papel?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	282 /284

Referencias

1. Aguilar-Santelises L, Corona-Ortega MT, García-del Valle A, Rangel-Corona R, Cruz-Millán M. Antología para los laboratorios de Bioquímica Celular y de los Tejidos I y Laboratorio Integral de Biología I. 2a ed. México: FES Zaragoza; 2007.
2. Campbell MK, Farrell SO. Bioquímica. 6a ed. México DF: Cengage Learning; 2010.
3. García F, Rosello J, Santamarina M. Introducción al funcionamiento de las plantas. Valencia: Editorial de la UPV; 2006.
4. Hall D. Fotosíntesis. Madrid: Omega; 1997.
5. McKee T, McKee J. Bioquímica: las bases moleculares de la vida. 4a ed. Madrid: Mc Graw Hill-Interamericana; 2009.
6. Voet D, Voet JG, Pratt ChW. Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular. 2ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	283 /284

MATERIAL BÁSICO

- ✓ Agua destilada (en cada sesión deberá tener cada equipo por lo menos 1 litro de agua).
- ✓ Estuche de disección (tijeras, pinzas y bisturí).
- ✓ Papel seda especial para limpiar lentes.
- ✓ Agitador de vidrio de 15 o 20 cm.
- ✓ Papel pH y papel tornasol.
- ✓ Papel filtro de diferentes tamaños de poro.
- ✓ Baño maría para calentamiento.
- ✓ Vidrio de reloj de 10 cm.
- ✓ Espátula.
- ✓ Frasco de torundas con alcohol.
- ✓ Ligadura.
- ✓ Asa bacteriológica.
- ✓ Jeringa desechable de 5 mL.
- ✓ Frascos goteros.
- ✓ Frascos de diferentes capacidades.
- ✓ Pipetas Pasteur con bulbo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE BIOQUÍMICA CELULAR Y DE
LOS TEJIDOS I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML07	02/08/2022	#2	284 /284

- ✓ Cinta masking tape, lápiz graso y marcador.
- ✓ Pizeta de 500 mL.
- ✓ Tubos de ensaye de 13 x 100 mm y 16 x 150 mm.
- ✓ Escobillón para tubos de ensaye.
- ✓ Jabón y franela para limpiar su área de trabajo.